Chemische und enzymatische Synthese von Fragmenten der terminalen inverted-repeat-Sequenz der DNA hypotricher Ciliaten

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Knut Cloß
aus Frankenholz

1985

Chemische und enzymatische Synthese von Fragmenten der terminalen inverted-repeat-Sequenz der DNA hypotricher Ciliaten

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Knut Cloß
aus Frankenholz

1985

Tag der mündlichen Prüfung: 6. November 1985

Dekan:	Prof. Dr. K.-A. Kovar
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. H. Schott
2. Berichterstatter:	Doz. Dr. H. Eckstein

Meinen Eltern gewidmet

So eine Arbeit wird eigentlich nie fertig, man muß sie für fertig erklären, wenn man nach Zeit und Umständen das mögliche getan hat.

J.W.v.Goethe

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von April 1982 bis August 1985 am Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen unter Anleitung von Prof. Dr. H. Schott angefertigt.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. H. Schott für die Stellung des Themas, für viele nützliche Anregungen und die fördernde Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.
Allen derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern des Arbeitskreises danke ich für die stete Diskussionsbereitschaft.
Herrn Doz. Dr. H. Eckstein danke ich für viele wertvolle Hinweise im Zusammenhang mit den HPLC-Trennungen.
Mein besonderer Dank gilt allen Mitarbeitern des Arbeitskreises von Prof. Dr. Ammermann, allen voran Frau Dipl. Biochem. Dr. E. Helftenbein und Herrn Dipl. Biol. K. Conzelmann, für viele wertvolle Tips und Anregungen im Zusammenhang mit der Gelelektrophorese und der Ligase-Reaktion.

Die vorliegende Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt.

INHALT

A.	EINLEITUNG und PROBLEMSTELLUNG	1
B.	ALLGEMEINER TEIL	9
1.	Darstellung des Octanucleosidheptakisphosphats $d(G_4T_4)$ und des Dodecanucleosidundecakisphosphats $d(T_4G_4T_4)$	9
1.1	Darstellung der tetrameren Blöcke $(MeOTr)(dT^{O\!-})_4^-$, $[(MeO)_2Tr](dibG^{O\!-})_4^-$ und $(dT^{O\!-})_3dT(Bz)$	9
1.2	Darstellung des Octanucleosidheptakisphosphats $[(MeO)_2Tr](dibG^{O\!-})_4(dT^{O\!-})_3dT(Bz)$	12
1.3	Darstellung des Dodecanucleosidundecakisphosphats $(MeOTr)(dT^{O\!-})_4(dibG^{O\!-})_4(dT^{O\!-})_3dT(Bz)$	12
1.4	Abspaltung der Schutzgruppen	19
1.5	Säulenchromatographische Isolierung des Octameren $d(G_4T_4)$ und des Dodecameren $d(T_4G_4T_4)$ aus dem Kondensationsansatz zum geschützten Dodecameren	19
1.6	HPLC-Reinigung der entschützten Oligonucleotide	23
1.7	Identifizierung der Oligonucleotide $d(G_4T_4)$ und $d(T_4G_4T_4)$ nach der Fingerprintmethode	30
2.	Blockweise Verlängerung mit Hilfe des Enzyms T_4-DNA-Ligase	36
C.	EXPERIMENTELLER TEIL	52
1.	Material	52
1.1	Geräte	52
1.2	Reagenzien	53
1.2.1	Chemikalien	53
1.2.2	Chromatographiematerial	55
1.2.3	Radionuklide und Röntgenfilme	55
1.2.4	Enzyme	56
1.2.5	Synthetisierte Chemikalien	56

1.3	Puffer	57
1.4	Homomixe	58
1.5	Darstellung geschützter Monomerer	59
1.5.1	$\left[(MeO)_2Tr\right]$dibG	59
1.5.2	$\left[(MeO)_2Tr\right]$dT, (MeOTr)dT	59
1.5.3	$\left[(MeO)_2Tr\right]$dT(Bz)	59
1.5.4	$\left[(MeO)_2Tr\right]$dibG$^{O-}_{=}Ba^{2+}_{0,5}$, $\left[(MeO)_2Tr\right]$dT$^{O-}_{=}Ba^{2+}_{0,5}$, (MeOTr)dT$^{O-}_{=}Ba^{2+}_{0,5}$	60
1.6	Darstellung von $\left[\gamma^{32}P\right]$ATP	60
2.	Methoden	61
2.1	Chromatographische Verfahren	61
2.1.1	Papierchromatographie	61
2.1.2	Dünnschichtchromatographie	61
2.1.3	Chromatographie an Kieselgelsäulen	62
2.1.4	Säulenchromatographische Trennung des entschützten Dodecanucleosidundecakisphosphats d($T_4G_4T_4$) an DEAE-Cellulose	62
2.1.5	HPLC	63
2.1.6	Gelelektrophorese	64
2.2	Cyanoethylierung	65
2.3	Kondensation	65
2.4	Abspaltung der Schutzgruppen	66
2.4.1	Detritylierung (Darstellung von 5'OH-Komponenten	66
2.4.2	Decyanoethylierung	67
2.4.3	Entschützen synthetisierter Oligonucleotide	67
2.5	Sequenzierung von Oligonucleotiden nach der Fingerprintmethode	68
2.5.1	Kinase-Reaktion	68
2.5.2	Partialabbau mit Phosphodiesterase aus Schlangengift	69
2.6	Enzymatische Verlängerung mit Hilfe der Ligase-Reaktion	69
D.	ZUSAMMENFASSUNG	71
E.	LITERATUR	72

Abkürzungen

ADP	Adenosin-5'-Diphosphat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
Bz	Benzoyl-
CA	Cellulose acetat
Ci	Curie
CNET	Cyanoethyl-
cpm	Counts pro Minute
DC	Dünnschichtchromatographie
DEAE	Diethylaminoethyl-
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DTE	Dithioerithrit, Clelands Reagenz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
h	Stunde
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
ib	Isobutyryl-
$(MeO)_2Tr$	Dimethoxytrityl-
(MeOTr)	Monomethoxytrityl-
NAD	ß-Nicotinamidadenindinucleotid
PAA	Polyacrylamid
PDE	Phosphodiesterase aus Schlangengift
PNK	Polynucleotidyl-Kinase
QAE	Diethyl(2-hydroxypropyl)aminoethyl-
RNA	Ribonucleinsäure
RP	reversed-phase
RT	Raumtemperatur
TBA	Tetrabutylammoniumhydrogensulfat
TEA	Triethylamin
TEAB	Triethylammoniumhydrogencarbonat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TPS	2,4,6-Triisopropylbenzolsulfonsäurechlorid
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Einheit
UV	Ultraviolett

A. EINLEITUNG und PROBLEMSTELLUNG

Die Sequenzanalyse der DNA des Makronucleus von verschiedenen hypotrichen Ciliaten wie z. B. Stylonychia hat die Existenz von "inverted-repeat"-Sequenzen an beiden Enden eines jeden DNA-Moleküls bewiesen(1).
Die Sequenz dieser terminalen "inverted repeats" ist bei Stylonychia(2)

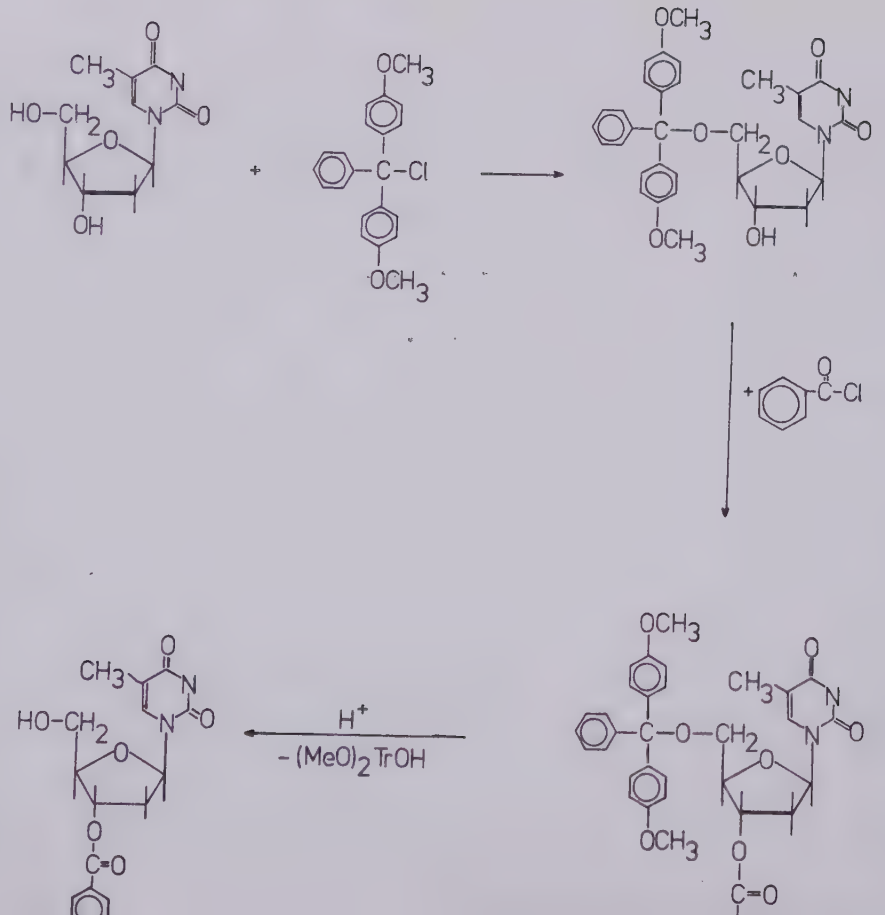
$$5'C_4A_4C_4A_4C_4$$

$$3'G_4T_4G_4T_4G_4T_4G_4T_4G_4$$

Auch in anderen niederen Eukarionten können ähnliche, sich wiederholende Sequenzen beobachtet werden. Sie spielen dort aller Wahrscheinlichkeit nach eine Rolle als telomere Strukturen im Prozeß der DNA-Replikation(3).
Für physikalisch-chemische Untersuchungen werden Oligonucleotide mit diesen Sequenzen in präparativen Mengen (20 mg) benötigt. Nachdem es in unserem Labor gelungen ist, die Oligonucleotide $d(A_4C_4)$, $d(C_4A_4C_4)$, $d(A_4C_4A_4C_4)$ und $d(C_4A_4C_4A_4C_4)$ im präparativen Maßstab darzustellen(25), wird in der vorliegenden Arbeit die chemische Synthese des DNA-Fragments $d(T_4G_4T_4)$ beschrieben, das zu den obigen Sequenzen komplementär ist. Darüber hinaus wird über die enzymatische Blockkondensation dieser Oligonucleotide berichtet.
Für die chemische Synthese im präparativen Maßstab wird die Triestermethode in Lösung gewählt, weil die Phosphoamiditmethode als trägergebundene Methode nur für kleinere Mengen konzipiert ist(4) und damit für unsere Zwecke ausscheidet. Das Konzept der Triestermethode sei nur kurz skizziert, da es in mehreren Übersichtsartikeln ausführlich beschrieben ist(5-8).
Ausgehend von den beiden käuflichen Nucleosiden dT und dG werden zuerst die Nucleobasen gezielt mit Schutzgruppen versehen. Obwohl bei anderen Autoren(22) der Einbau von Schutzgruppen in der 4-O-Stellung des dT und in der 2-N-Stellung und der 6-O-Stellung des dG empfohlen wird, um Nebenreaktionen bei der Phosphorylierung zu vermeiden, wurde im vorliegenden Fall nur die primäre Aminofunktion des 2'-Desoxygua-

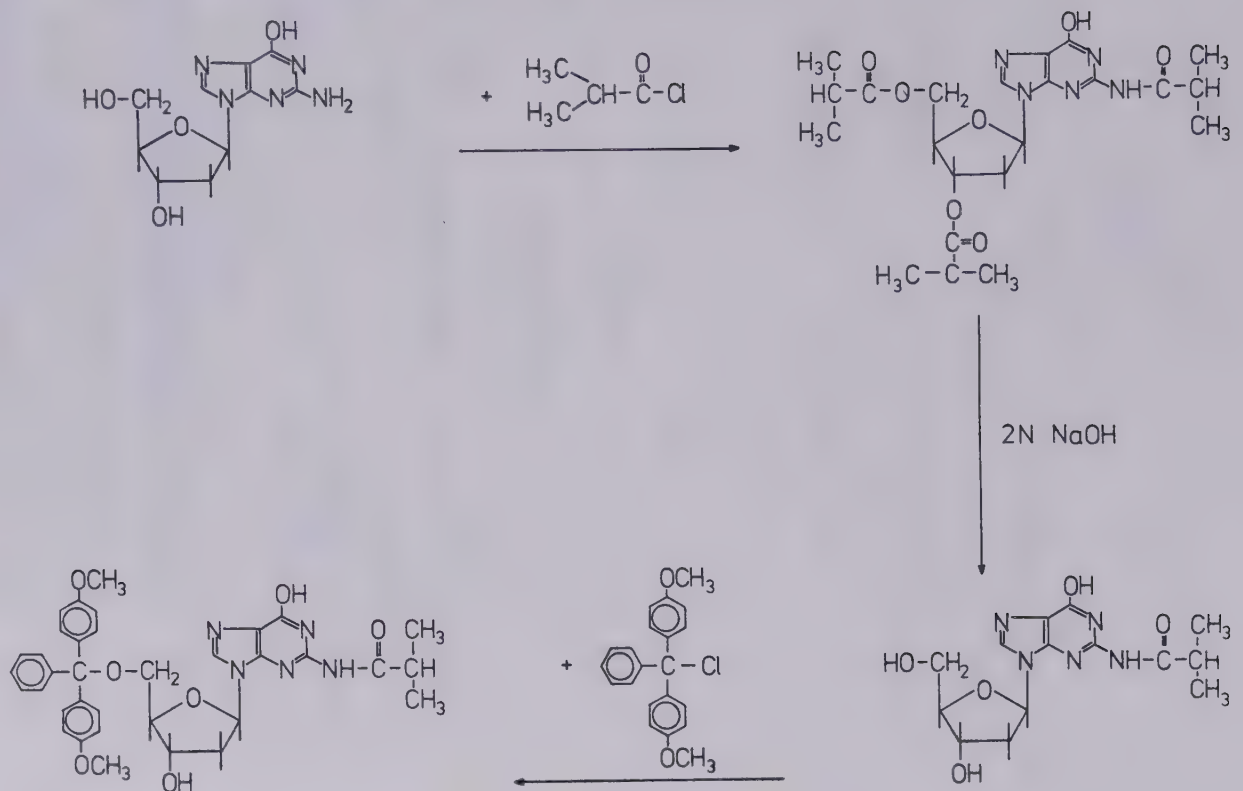
nosins mit dem Isobutyryl-Rest geschützt. Auf eine Blockierung der Sauerstoff-Funktionen wird verzichtet, da bei Kondensationen keine Unterschiede in der Reinheit und Einheitlichkeit der Produkte festgestellt werden konnte,gleich ob wir O-geschützte oder ungeschützte Nucleotide eingesetzt haben.
Nachdem auch die 5'OH-Gruppe mit der Dimethoxytrityl- bzw. mit der Monomethoxytrityl-Gruppe (wenn die 5'OH-Gruppe zum 5'terminalen Nucleosid gehört) geschützt ist, wird das vollgeschützte Nucleosid in ein Phosphodiesterderivat überführt, d.h. die 3'OH-Gruppe wird unter gleichzeitiger Einführung der o-Chlorphenyl-Gruppe als Phosphatschutzgruppe phosphoryliert(23 (Schema 2).
Um hieraus die monomere 3'Phosphat-Komponente zu erhalten, wird das geschützte Nucleotid als Bariumsalz gefällt(C.1.5.4).
Die monomere 5'OH-Komponente erhält man durch direkte Umsetzung mit Cyanoethanol(24)(C.2.2), anschließender Detritylierung(C.2.4.1) und chromatographischer Reinigung an Kieselgel (Tabelle 2).
Die 3'OH-Gruppe des 3'terminalen Bausteins wird mit Hilfe der Benzoyl-Gruppe blockiert(24)(Schema 1).
Unter Knüpfung einer 3'-5'Triesterbindung unter Zuhilfenahme eines Kondensationsmittels entsteht aus der 3'Phosphat- und der 5'OH-Komponente ein vollgeschütztes Dinucleotid (Schema 3).
In der Triestermethode stehen heute eine Vielzahl von Kondensationsmitteln zur Verfügung. Die Kondensationsmittel entstehen in der Regel durch die Reaktion eines Sulfonsäurechlorids mit einem sekundären Amin. Die meisten Kondensationsmittel müssen vor der Reaktion in aufwendiger Weise dargestellt werden(9-13), sind aber nur kurze Zeit haltbar. Als neue Variante beschreiben Efimov et al.(14) eine Mischung aus TPS und 1-Methylimidazol; die Kondensationszeit soll dabei deutlich herabgesetzt werden. Man kann aber auch eine Mischung aus Sulfonsäurechlorid und sekundärem Amin direkt ohne vorherige Reaktion als Kondensationsmittel einsetzen(15). Die Kondensationsdauer beträgt in diesem Fall 60 min.
Diese Methode erschien mir als die beste, so daß in der vorliegenden Arbeit ausschließlich eine Mischung aus TPS und Tetrazol eingesetzt wird.

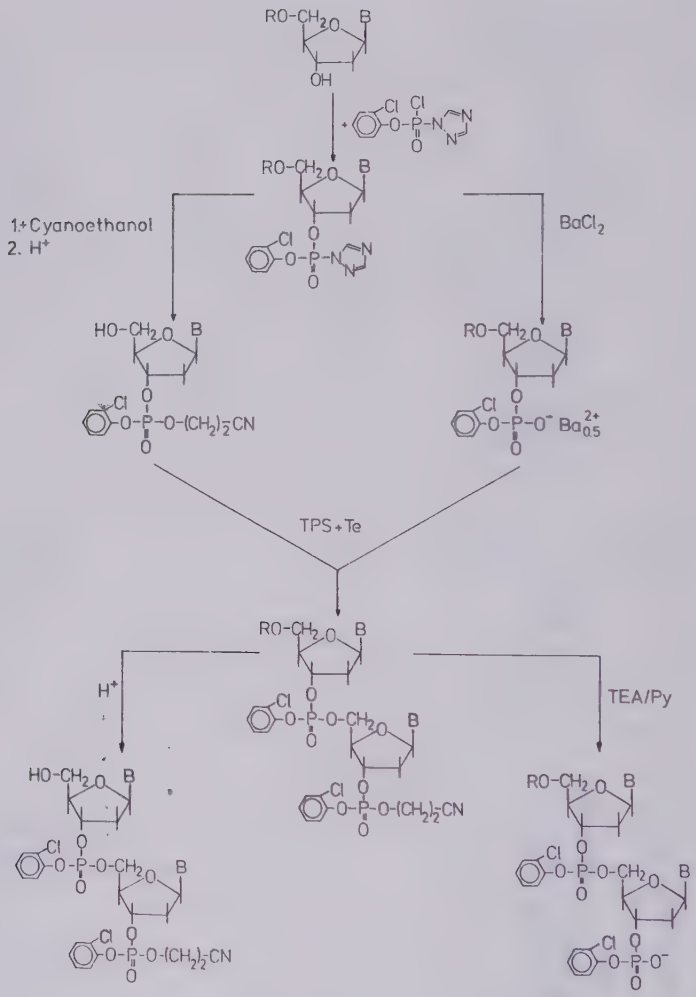
Das vollgeschützte Dinucleotid wird anschließend detrityliert und dient nachfolgend als oligomere 5'OH-Komponente oder es wird decyanoethyliert und dient als oligomere 3'Phosphat-Komponente, wenn man daraus längere Oligonucleosidphosphate aufbauen will.
Der große Vorteil der Triestermethode in Lösung ist, daß das Kondensationsprodukt nach jedem Reaktionsschritt einer chromatographischen Reinigung unterworfen wird. Nach Entfernung aller Schutzgruppen kann ein Aliquot eines jeden Produkts mit Papierchromatographie, HPLC oder mit Hilfe der radioaktiven Markierung auf Einheitlichkeit überprüft werden.



Schema 1a:
Syntheseweg zur Darstellung von dT(Bz)

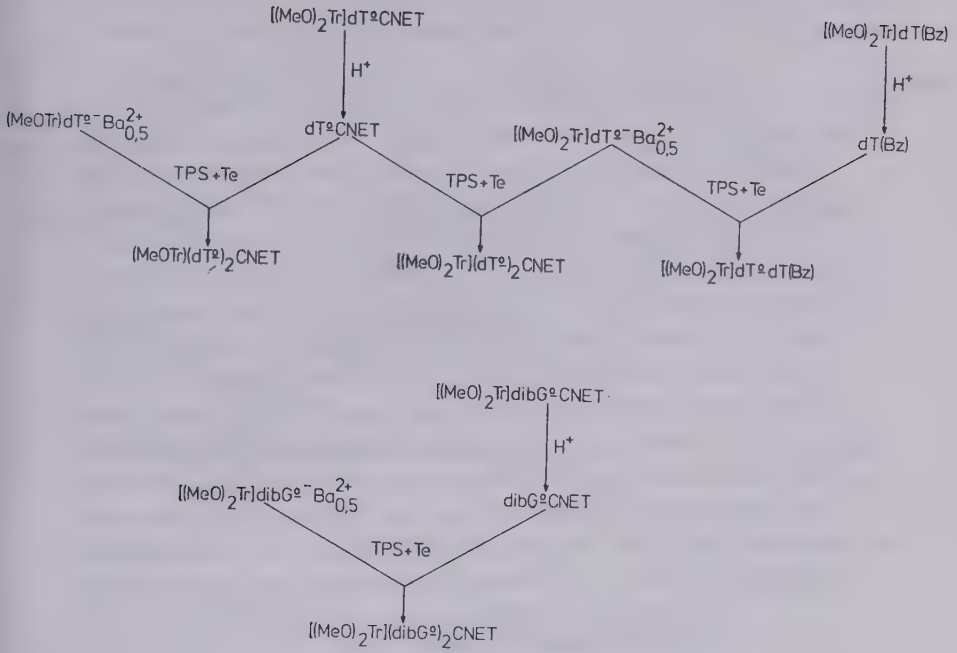
Schema 1b: Syntheseweg zur Darstellung von $(MeO)_2Tr$ dibG





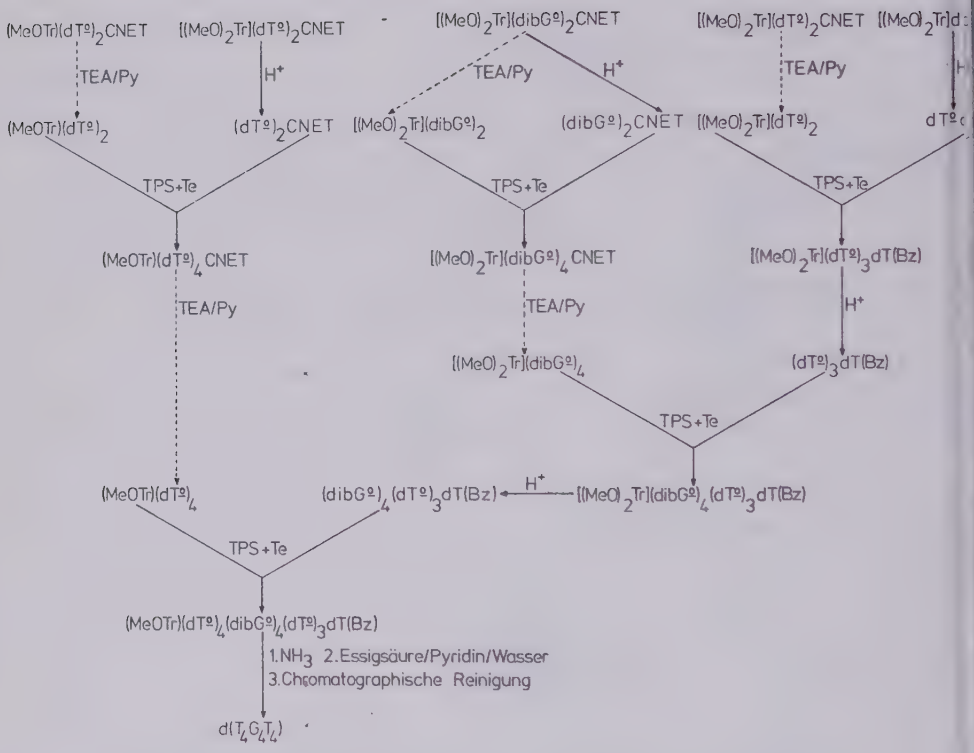
Schema 2: Darstellung der oligomeren Hydroxyl- und Phosphat-Komponenten nach der Triestermethode in Lösung

R = $(MeO)_2Tr$ = Dimethoxytrityl-
B = Thymin oder Guanin in geschützter Form
TEA = Triethylamin Py = Pyridin
TPS = 2,4,6-Triisopropylbenzolsulfonsäurechlorid
Te = 1H-Tetrazol



Schema 3: Syntheseweg zur Darstellung von vollgeschützten Dinucleosidphosphaten

TPS = 2,4,6-Triisopropylbenzolsulfonsäurechlorid
Te = 1H-Tetrazol
Bz = Benzoyl-
CNET = Cyanoethyl-
(MeOTr) = Monomethoxytrityl-
$(MeO)_2Tr$ = Dimethoxytrityl-



Schema 4: Syntheseweg zur Darstellung des Dodecameren $d(T_4G_4T_4)$

B. ALLGEMEINER TEIL

1. Darstellung des Octanucleosidheptakisphosphats $d(G_4T_4)$ und des Dodecanucleosidundecakisphosphats $d(T_4G_4T_4)$

Für die Darstellung der beiden Oligonucleosidphosphate $d(G_4T_4)$ und $d(T_4G_4T_4)$ wird mit der Synthese der drei verschiedenen Tetramere $(MeOTr)(dT^{\underline{O}})_4CNET$, $[(MeO)_2Tr](dibG^{\underline{O}})_4CNET$ und $[(MeO)_2Tr](dT^{\underline{O}})_3dT(Bz)$ begonnen (Schema3, 4). Aus den beiden Blöcken $[(MeO)_2Tr](dibG^{\underline{O}})_4^-$ und $(dT^{\underline{O}})_3dT(Bz)$ wird das Octamere $[(MeO)_2Tr](dibG^{\underline{O}})_4(dT^{\underline{O}})_3dT(Bz)$ aufgebaut, das nach Entfernung der $(MeO)_2Tr$-Gruppe mit dem Tetrameren $(MeOTr)(dT^{\underline{O}})_4^-$ zum Dodecameren $(MeOTr)(dT^{\underline{O}})_4(dibG^{\underline{O}})_4(dT^{\underline{O}})_3dT(Bz)$ verlängert wird. Da für den Aufbau der verschiedenen Tetramere die Dimere $[(MeO)_2Tr](dT^{\underline{O}})_2CNET$ und $[(MeO)_2Tr](dibG^{\underline{O}})_2CNET$ mehrfach verwendet werden können, werden sie in Ansätzen von 12,1 bzw. 13,4 mmol dargestellt. Die Ansätze für die verschiedenen geschützten Nucleotid-Blöcke werden zum Teil bis zu viermal durchgeführt, da die gewünschten Mengen in einem Kondensationsansatz nicht erreicht werden konnten.

1.1 Darstellung der tetrameren Blöcke $(MeOTr)(dT^{\underline{O}})_4^-$, $[(MeO)_2Tr](dibG^{\underline{O}})_4^-$ und $(dT^{\underline{O}})_3dT(Bz)$

Der Aufbau der Tetramere geht aus von den monomeren 3'Phosphat-Komponenten $(MeOTr)dT^{\underline{O}-}Ba^{2+}_{O,5}$, $[(MeO)_2Tr]dibG^{\underline{O}-}Ba^{2+}_{O,5}$ und $[(MeO)_2Tr]dT^{\underline{O}-}Ba^{2+}_{O,5}$ sowie den 5'OH-Komponenten dT(Bz), und $dibG^{\underline{O}}CNET$. Für die Darstellung der 5'OH-Komponenten $dT^{\underline{O}}CNET$ und $dibG^{\underline{O}}CNET$ wird das 5'geschützte Nucleosid zuerst phosphoryliert und dann sofort cyanoethyliert, indem man es direkt mit Cyanoethanol umsetzt(24). Als Kondensationsmittel dient dabei 1-Methylimidazol. Wenn in der DC-Kontrolle keine Phosphat-Komponente mehr am Startpunkt erkennbar ist, spaltet man die $(MeO)_2Tr$-Gruppe mit 2%iger Benzolsulfonsäurelösung ab. Die entstandenen monomeren 5'OH-Komponenten werden an Kiesel-

gel nach den Bedingungen der Tabelle 2 gereinigt.

Zunächst werden aus den monomeren 3'Phosphat-Komponenten und 5'OH-Komponenten die erforderlichen Dimere $dT^{\underline{O}}dT(Bz)$, $[(MeO)_2Tr](dT^{\underline{O}})_2CNET$, $(MeOTr)(dT^{\underline{O}})_2CNET$ und $[(MeO)_2Tr](dibG^{\underline{O}})_2CNET$ synthetisiert (Schema3). Nach Abspaltung der Cyanoethyl- bzw. der Trityl-Schutzgruppe werden die Dimerblöcke zu den Tetrameren $(dT^{\underline{O}})_3dT(Bz)$, $[(MeO)_2Tr](dT^{\underline{O}})_4CNET$ und $[(MeO)_2Tr](dibG^{\underline{O}})_4CNET$ verlängert (Schema 4).

Der beschrittene Kondensationsweg bietet folgende Vorteile:

- Die Dimerblöcke $[(MeO)_2Tr](dibG^{\underline{O}})_4CNET$ und $[(MeO)_2Tr](dT^{\underline{O}})_4CNET$ können auf der einen Seite als 5'OH-Komponente nach vorangegangener Detritylierung, auf der anderen Seite als 3'Phosphat-Komponente nach Abspaltung der Cyanoethyl-Gruppe eingesetzt werden.
- Die Kondensationsprodukte weisen eine doppelt so lange Kettenlänge auf wie die Ausgangsverbindungen und unterscheiden sich in ihren R_f-Werten beträchtlich. Dies hat zur Folge, daß die Produkte von unumgesetztem Ausgangsmaterial gut abgetrennt werden können.

Die Kondensationen werden ausschließlich mit Pyridin als Lösungsmittel durchgeführt. Die Bedingungen zur Synthese sind in Tabelle 1 angegeben. Die Reaktionen verlaufen unter Feuchtigkeitsausschluß bei Raumtemperatur. Die mono- und oligomeren Phosphat-Komponenten werden immer im Überschuß in Bezug auf die mono- und oligomeren 5'OH-Komponenten eingesetzt. Eine Mischung von TPS und Tetrazol im Verhältnis 1 : 3 wird in dreifachem Überschuß bezogen auf die 3'Phosphat-Komponente als Kondensationsmittel eingesetzt.

Der Reaktionsverlauf wird dünnschichtchromatographisch verfolgt. Die Reaktion ist als beendet zu betrachten, wenn die 5'OH-Komponente aus dem Reaktionsansatz verschwunden ist. Die Reaktion wird dann abgebrochen und das Reaktionsgemisch an Kieselgel chromatographiert. Die Chromatographiebedingungen sind in Tabelle 2 zusammengefaßt.

Bei Verbindungen, die nachfolgend als 5'OH-Komponente eingesetzt werden sollen, wird vor der Chromatographie an Kieselgel noch die $(MeO)_2Tr$-Schutzgruppe abgespalten. Auf diese Weise

kann man einen Reinigungsschritt einsparen, muß aber trotzdem keine Einbußen an Ausbeute und Reinheit der Produkte hinnehmen.
Die Elution der Säule läuft in folgenden Schritten ab:

Nachdem die Probe auf die Säule aufgetragen worden ist, wird so lange mit 1,5 bis 3,0 l Chloroform eluiert, bis die Absorption des Eluats auf etwa 0,5 A_{260}-Einheiten abgesunken ist. Anschließend wird die Elution mit Chloroform-Ethanol-Gemischen fortgesetzt.

Die eluierten Fraktionen werden dünnschichtchromatographisch auf Einheitlichkeit geprüft, einheitliche Produktfraktionen werden vereinigt, eingeengt und aus Petrolether/Diethylether 4 : 1 (v/v) gefällt. Die Ausbeuten für die einzelnen di- und tetrameren Bausteine schwanken zwischen 95 und 35 %, wobei die Ausbeuten bei Guanosinnucleotiden in der Regel schlechter als bei Thymidinnucleotiden sind.
Die papierchromatographische Untersuchung liefert ebenfalls Beweise für die Einheitlichkeit des Kondensationsproduktes. Hierzu werden bei einem Aliquot des geschützten Oligonucleosidphosphats sämtliche Schutzgruppen mit Ausnahme der o-Chlorphenyl-Schutzgruppe 3'endständiger Phosphate abgespalten. Aufgrund der Nichtabspaltbarkeit der o-Chlorphenyl-Schutzgruppe lassen sich die betreffenden Oligonucleosidphosphate nur auf Einheitlichkeit überprüfen.
Eine weitere Möglichkeit, das Produkt auf Einheitlichkeit zu prüfen, bietet die Homochromatographie nach vorausgegangener radioaktiver Markierung am 5'OH-Ende des entschützten Oligonucleotids.
Eine eindeutige Identifizierung ist bei Produkten möglich, die in 3'Stellung eine Benzoyl-Schutzgruppe tragen, wenn man sie mit in unserem Labor hergestellten Referenznucleotiden vergleicht.
Anschließend werden bei den Nucleotid-Blöcken entsprechend ihrer weiteren Verwendung die Cyanoethyl- bzw. die Dimethoxytrityl-Schutzgruppe abgespalten. Die 3'Phosphat-Komponenten werden nach Entfernung des Triethylamins aus Petrolether/Diethylether 4 : 1 (v/v) gefällt.

1.2 Darstellung des Octanucleosidheptakisphosphats $[(MeO)_2Tr](dibG^{O}_{-})_4(dT^{O}_{-})_3dT(Bz)$

Die Synthese erfolgt nach den Bedingungen der Tabelle 1 aus den beiden Tetrameren $[(MeO)_2Tr](dibG^{O}_{-})_4^{-}$ und $(dT^{O}_{-})_3dT(Bz)$. Die Bedingungen für die chromatographische Reinigung können Tabelle 2 entnommen werden. Nach dem Ausfällen des Produkts aus vier Ansätzen erhält man 2 g vollgeschütztes Produkt, was einer Ausbeute von 41 % entspricht. Da der octamere Nucleotid-Block in einer weiteren Kondensationsreaktion als 5'OH-Komponente eingesetzt werden soll, muß noch die Dimethoxytrityl-Schutzgruppe abgespalten werden (C.2.4.1). Nach der Spaltung wird $(dibG^{O}_{-})_4(dT^{O}_{-})_3dT(Bz)$ aus 250 ml Petrolether/Diethylether 4 : 1 (v/v) gefällt. Aus vier Ansätzen erhält man 1,8 g (95% Ausbeute).

1.3 Darstellung des Dodecanucleosidundecakisphosphats $(MeOTr)(dT^{O}_{-})_4(dibG^{O}_{-})_4(dT^{O}_{-})_3dT(Bz)$

Das Dodecanucleosidundecakisphosphat wird aus dem Tetrameren $(MeOTr)(dT^{O}_{-})_4^{-}$ und dem Octameren $(dibG^{O}_{-})_4(dT^{O}_{-})_3dT(Bz)$ dargestellt (Schema 4). Nach diesem Kondensationsschritt läßt sich bei der Chromatographie an Kieselgel (Tabelle 2) nur noch die im Überschuß eingesetzte 3'Phosphatkomponente $(MeOTr)(dT^{O}_{-})_4^{-}$ abtrennen.
Das unumgesetzte Octamere kann nicht mehr entfernt werden, da sich das Octamere und das Dodecamere nur wenig im R_f-Wert unterscheiden.
Um das Dodecamere $d(T_4G_4T_4)$ in chromatographisch reiner Form zu erhalten, müssen noch mehrere Chromatographieschritte angeschlossen werden.

Tabelle 1: Bedingungen und Ergebnisse bei der Synthese geschützter Oligodesoxynucleotide. Die Kondensationen werden bei Raumtemperatur mit Hilfe einer Mischung aus 2,4,6-Triisopropylbenzolsulfonsäurechlorid (TPS) und Tetrazol in 2o-3o ml trockenem Pyridin während 1 h durchgeführt.

Kondensationsprodukt			3'Phosphatkomponente + 5'OH-Komponente	Kondensationsmittel TPS + Tetrazol
Menge (mmol);	(g);	Ausbeute (%)	(mmol); (g)	(mmol); (g)
$[(MeO)_2Tr](dT^{o-})_2CNET$			$[(MeO)_2Tr]dT^{o-}$	
8,2o;	9,8o;	98	1o,3o; 8,3o	31,o; 9,4
			+ $dT^{o-}CNET$	+
			8,6o; 4,2o	93,o; 6,5
$(dT^{o-})_2CNET$			$[(MeO)_2Tr]dT^{o-}$	
3,3o;	3,oo;	95	4,3o; 3,5o	12,5; 3,8
			+ $dT^{o-}CNET$	+
			3,5o; 1,7o	37,5; 2,6
$dT^{o-}dT(Bz)$			$[(MeO)_2Tr]dT^{o-}$	
2,9o;	2,2o;	83	4,2o; 3,4o	12,5; 3,8
			+dT(Bz)	+
			3,5o; 1,2o	37,5 2,6
$[(MeO)_2Tr](dT^{o-})_3dT(Bz)$			$[(MeO)_2Tr](dT^{o-})_2$	
1,5o;	2,8o;	61	3,4o; 4,1o	1o,2; 3,1
			+ $dT^{o-}dT(Bz)$	+
			2,8o; 2,2o	3o,6; 2,1

Fortsetzung Tabelle 1:

Kondensationsprodukt Menge (mmol); (g);	Ausbeute (%)	3'Phosphatkomponente + 5'OH-Komponente (mmol); (g)	Kondensationsmittel TPS + Tetrazol (mmol); (g)
(MeOTr)(dT$^{o}_{-}$)$_2$CNET 5,4o; 5,9o;	8o	(MeOTr)dT$^{o}_{-}$ 7,6o; 5,8o + dT$^{o}_{-}$CNET 6,9o; 3,2o	22,8; 6,9 + 68,4; 4,7
(MeOTr)(dT$^{o}_{-}$)$_4$CNET 2,7o; 5,4o;	9o	(MeOTr)(dT$^{o}_{-}$)$_2$ 3,6o; 4,oo; + (dT$^{o}_{-}$)$_2$CNET 3,oo; 2,7o	1o,8; 3,3 + 32,4; 2,3
[(MeO)$_2$Tr](dibG$^{o}_{-}$)$_2$CNET 4,2o; 5,8o;	62[a]	[(MeO)$_2$Tr]dibG$^{o}_{-}$ 8,oo; 7,2o + dibG$^{o}_{-}$CNET 6,7o; 3,9o	24,o; 7,2 + 72,o; 5,1
[(MeO)$_2$Tr](dibG$^{o}_{-}$)$_4$CNET o,63; 1,5o;	35[a]	[(MeO)$_2$Tr](dibG$^{o}_{-}$)$_2$ 2,2o; 2,9o + (dibG$^{o}_{-}$)$_2$CNET 1,8o; 2,oo	6,6; 2,o + 19,8; 1,4

Kondensationsprodukt

Menge (mmol); (g);	Ausbeute (%)	3'Phosphatkomponente + 5'OH-Komponente (mmol); (g)	Kondensationsmittel TPS + Tetrazol (mmol); (g)
[(MeO)$_2$Tr](dibG^{ibu})$_4$(dT^{ac})$_3$dT(Bz)		[(MeO)$_2$Tr](dibG^{ibu})$_4$	
o,1o; o,5o;	41[c]	o,4o; o,9o	1,2; o,4
		+(dT^{ac})$_3$dT(Bz)	+
		o,3o; o,5o	3,6; o,3
(MeOTr)(dT^{ac})$_4$(dibG^{ibu})$_4$(dT^{ac})$_3$dT(Bz)		(MeOTr)(dT^{ac})$_4$	
o,o6; o,35;	46b	o,17; o,3o	1,7; o,5
		+ (dibG^{ibu})$_4$(dT^{ac})$_3$dT(Bz)	+
		o,14; o,5o	5,1; o,4

gemittelt aus a 2, b 3 und c 4 Ansätzen

Tabelle 2: Bedingungen und Ergebnisse der chromatographischen Trennungen von A: tritylierten Nucleosiden, B: Kondensationsgemischen, C: detritylierten Oligonucleotiden an Kieselgelsäulen, die in mehrstufigen $CHCl_3/C_2H_5OH$-Gradienten eluiert werden. Die jeweiligen Reaktionsansätze werden nach der Kondensation(3) oder Detritylierung(C) konzentriert und in $CHCl_3$ gelöst aufgetragen.

	Isoliertes Produkt	Menge (mmol);	Menge (g);	Ausbeute (%)	Aufgetragene Menge (g)	Säulendimension (cm)	Schritt	Elutionsbedingungen Eluent $CHCl_3:C_2H_5OH$	Volumen (l)
A	[$(MeO)_2$Tr]dT	36,4o;	19,8o;	88	27,2	13 x 2o	1	1oo	1,o
							2^a	98 : 2	2,o
A	(MeOTr)dT	39,4o;	2o,2o;	95	25,8	13 x 2o	1	1oo	1,o
							2^{aa}	98 : 2	2,o
A	[$(MeO)_2$Tr]dibG	26,9o;	17,2o;	92	22,4	13 x 2o	1	1oo	1,5
							2^a	95 : 5	2,5
C	dT^{o}CNET	19,36;	9,4o;	97	15,8	5,5 x 26	1	1oo	1,o
							2^a	95 : 5	2,o
C	dT(Bz)	7,8o;	2,7o;	86	5,9	5,5 x 2o	1	1oo	2,o
							2^a	95 : 5	1,5
C	dibG^{o}CNET	7,oo;	4,1o;	7o	11,7	5,5 x 26	1	1oo	1,o
							2^a	95 : 5	2,o
B	[$(MeO)_2$Tr](dT^{o})$_2$CNET	8,2o;	9,8o;	98	28,4	5,5 x 31	1	1oo	2,o
							2^a	95 : 5	2,o

Fortsetzung Tabelle 2:

	Isoliertes Produkt Menge (mmol); (g);	Ausbeute (%)	Aufgetragene Menge (g)	Säulendimension (cm)	Elutionsbedingungen Schritt	Eluent $CHCl_3$:C_2H_5OH	Volumen (l)
C	$(dT^{o-})_2CNET$				1	100	2,0
	3,30; 3,00;	95	4,2	5,5 x 18	2[a]	95 : 5	2,0
C	$dT^{o-}dT(Bz)$				1	100	2,0
	2,90; 2,20;	83	3,7	5,5 x 16	2[a]	95 : 5	1,5
B	$(MeOTr)(dT^{o-})_2CNET$				1	100	1,5
	5,40; 5,90;	80	20,6	5,5 x 30	2[a]	97 : 3	2,5
B	$[(MeO)_2Tr](dibG^{o-})_2CNET$				1	100	2,5
	4,20; 5,80;	62	23,4	5,5 x 30	2	95 : 5	1,0
					3[a]	92 : 8	1,0
					4[a]	90 : 10	1,0
C	$(dibG^{o-})_2CNET$				1	100	2,0
	6,87; 4,00;	88	10,8	5,5 x 16	2[a]	95 : 5	1,8
B	$[(MeO)_2Tr](dT^{o-})_3dT(Bz)$				1	100	2,0
	1,50; 2,80;	61	11,5	5,5 x 18	2[a]	95 : 5	2,0
C	$(dT^{o-})_3dT(Bz)$				1	100	1,5
	1,38; 2,20;	92	2,8	5,5 x 16	2	95 : 5	0,5
					3[a]	90 : 10	1,5
B	$(MeOTr)(dT^{o-})_4CNET$				1	100	2,0
	2,70; 5,40;	90	12,3	5,5 x 21	2[a]	95 : 5	

Fortsetzung Tabelle 2:

	Isoliertes Produkt Menge (mmol); (g); Ausbeute (%)	Aufgetragene Menge (g)	Säulendimension (cm)	Elutionsbedingungen Schritt	Eluent $CHCl_3$:C_2H_5OH	Volumen (l)
B	[$(MeO)_2$Tr](dibG^{ib})$_4$CNET			1	100	3,0
	0,63; 1,50; 35	8,3	5,5 x 20	2	95 : 5	2,7
				3[a]	90 : 10	2,0
				4[a]	85 : 15	2,0
				5[a]	80 : 20	1,5
B	[$(MeO)_2$Tr](dibG^{ib})$_4$(dT^{ib})$_3$dT(Bz)			1	100	2,5
	0,10; 0,50; 41	2,1	5,5 x 12	2	95 : 5	2,0
				3[a]	90 : 10	2,0
B	(MeOTr)(dT^{ib})$_4$(dibG^{ib})$_4$(dT^{ib})$_3$dT(Bz)			1	100	1,5
	0,06; 0,35; 46	1,7	5,5 x 12	2	95 : 5	1,0
				3[a]	90 : 10	1,8
				4[a]	80 : 20	1,0

a Bei diesem Schritt wird das gewünschte Produkt von der Säule eluiert.

1.4 Abspaltung der Schutzgruppen

Alle Schutzgruppen bis auf die Trityl-Reste werden durch Behandlung der Oligonucleosidphosphate mit konz. Ammoniak abgespalten. Danach werden die Trityl-Schutzgruppen mit einer Lösung aus Eisessig/Pyridin/Wasser 14 : 1 : 1 (V/V/V) entfernt. Der Ansatz wird mit Ammoniak neutralisiert, an Sephadex G-15 vom Salz befreit und anschließend lyophilisiert.

1.5 Säulenchromatographische Isolierung des Octameren $d(G_4T_4)$ und des Dodecameren $d(T_4G_4T_4)$ aus dem Kondensationsansatz zum geschützten Dodecameren

Das Gemisch aus der Kondensation von (MeOTr)$(dT^{O}_{-})_4$ mit (dibG$^{O}_{-}$)$_4$(dT^{O}_{-})$_3$dT(Bz) wird nach der Kieselgel-Säule gefällt, entschützt und lyophilisiert. 1/3 der lyophilisierten Probe wird jeweils in 7M Harstoff gelöst und auf eine DEAE-Cellulose-Säule (Säulenfüllung 2 x 50 cm) aufgetragen. Anschließend wird die Säule mit 1 l 0,05M NaCl/0,05M Tris-HCl pH 7,5/7M Harnstoff gewaschen. Es folgt ein linear steigender Gradient mit 2 l 0,05M NaCl/0,05M Tris-HCl pH 7,5/7M Harnstoff im Mischgefäß und 2 l 0,15M NaCl/0,05M Tris-HCl pH 7,5/7M Harnstoff im Vorratsgefäß. Daran schließt sich ein linear steigender Gradient mit 2 l 0,15M NaCl/0,05M Tris-HCl pH 7,5/7M Harnstoff im Mischgefäß und 2 l 0,3M NaCl/0,05M Tris-HCl pH 7,5/7M Harnstoff im Vorratsgefäß an. Die Elution wird beendet, indem man die Säule mit 1 l 1M NaCl wäscht.
Mit einer Schlauchpumpe wird der Fluß auf 250 ml/h eingestellt. Die Säulentemperatur beträgt beim Auftragen und Waschen mit 0,05M NaCl 22 °C, zu Beginn des linear steigenden Gradienten wird die Temperatur auf 50 °C erhöht.
Die Elution wird spektralphotometrisch bei 260 nm verfolgt, das Elutionsprofil (Figur 1) ergibt sich aus der graphischen Auftragung der bei 260 nm gemessenen Absorptionswerte gegen das Elutionsvolumen. Der Doppelpeak bei $d(G_4T_4)$ ist vermutlich auf den Gradientenwechsel zurückzuführen.

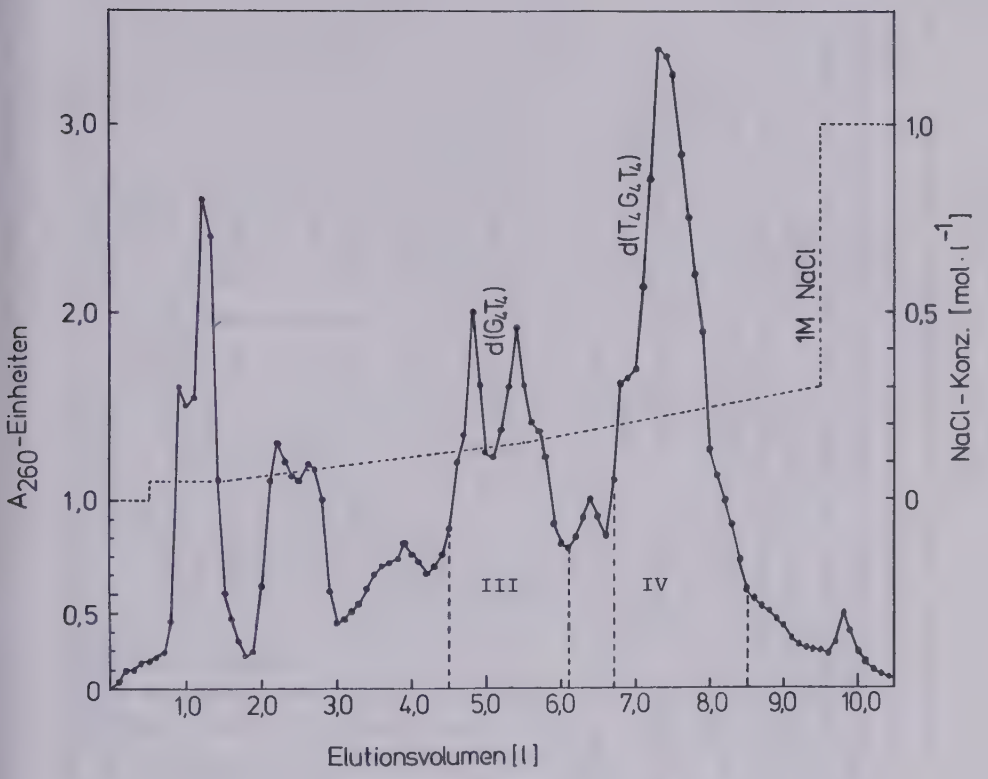
Die Gipfelfraktionen der einzelnen Peaks werden außer bei 260 nm noch zusätzlich bei 250 nm und bei 280 nm vermessen. Aus den gemessenen und errechneten Absorptionsverhältnissen für $d(G_4T_4)$ und $d(T_4G_4T_4)$ kann man Rückschlüsse auf die Zusammensetzung der Peaks ziehen.

Errechnete und gemessene Absorptionsverhältnisse für $d(G_4T_4)$ und $d(T_4G_4T_4)$ bei pH 7

	errechnet		gemessen	
	250/260	280/260	250/260	280/260
$d(G_4T_4)$	0,91	0,70	0,89	0,68
$d(T_4G_4T_4)$	0,83	0,71	0,85	0,69

Im vorliegenden Fall stimmen die Verhältnisse von Peak III der Figur 1 sehr gut mit $d(G_4T_4)$ überein. Die Verhältnisse von Peak IV deuten auf $d(T_4G_4T_4)$ hin.
Peak III und Peak IV werden an DEAE-Cellulose vom Harnstoff befreit. Die Elutionslösung wird auf ein geringes Volumen konzentriert und an einer Sephadex G-15-Säule vom restlichen Salz befreit. Die das Oligonucleotid enthaltende jeweilige Lösung wird einkonzentriert und lyophilisiert. Die beschriebene Säulentrennung wird dreimal durchgeführt. Folgende Mengen wurden isoliert:

$d(G_4T_4)$: 150 mg entsprechend 14,3% des vollgeschützten Gemisches aus Tabelle 2
$d(T_4G_4T_4)$: 350 mg entsprechend 33,3%



Figur 1: Elutionsprofil der säulenchromatographischen Trennung des Dodecameren $d(T_4G_4T_4)$ nach Entfernung aller Schutzgruppen. Die Trennung erfolgt an DEAE-Cellulose (Säulenfüllung 2 x 50 cm); der Durchfluß beträgt 250 ml/h. Die Elution erfolgt unter Zusatz von 7M Harnstoff bei 50°C und mit dem in der Figur gestrichelt eingezeichneten NaCl-Gradienten, der mit 0,05M Tris-HCl auf pH 7,5 gepuffert ist. Fraktionen innerhalb der senkrechten Strichelung werden vereinigt und wie beschrieben aufgearbeitet.

Tabelle 3: Ergebnisse der HPLC synthetischer Oligonucleosidphosphate an Nucleosil 7 C_{18}. Gemische mit bis zu 2,5 A_{260}-Einheiten werden an einer 250 x 4,6 mm-Säule, Gemische mit 2,5 A_{260}-Einheiten bis 60 A_{260}-Einheiten werden an einer 250 x 8 mm-Säule chromatographiert. Die Elution erfolgt in der Regel isokratisch, wobei entweder System 1 (reversed-phase-Chromatographie): Eluent A: 0,05M NH_4Ac pH 7,5; Eluent B: 0,05M NH_4Ac pH 7,5 in Methanol/Wasser 80 : 20 (v/v) oder System 2 (Ionenpaarchromatographie): Eluent A 0,0075M TBA pH 7,0; Eluent B: 0,0075M TBA pH 7,0 in Acetonitril/Wasser 75 : 25 (v/v) verwendet werden.

System	Oligonucleotid Bezeichnung	Aufgetragene Menge A_{260}-Einh.	Eluent Anteil von B (%)	Retentionszeit (min)	Figur
1	$d(G_4T_4)$	a) 2,3	25	23,55	2a
		b) 29,0	25	23,03	2b
1	$d(T_4G_4T_4)$	a) 1,0	30	15,28	3a
		b) 14,0	29	14,58	3b
2	$d(G_4T_4)$	a) 1,5	10 - 60[x]	25,28	4a
		b) 60,0	30	9,23	4b
		c) 1,2[y]	31	9,10	4c
2	$d(T_4G_4T_4)$	a) 2,5	50	12,92	5a
		b) 50,0	50	12,22	5b
		c) 0,85[y]	50	12,52	5c

x linearer Anstieg innerhalb von 30 min

y Rechromatographie der HPLC-gereinigten Produkte

1.6 HPLC-Reinigung der entschützten Oligonucleotide

Die HPLC-Trennungen werden nach zwei verschiedenen Methoden an Nucleosil 7 C_{18} durchgeführt. Trennungen an Partisil 10-SAX erwiesen sich als nicht praktikabel, weil der Hauptanteil der auf die Säule aufgetragenen Menge an Oligonucleotid irreversibel vom Säulenmaterial adsorbiert wurde.
Die erste Methode, HPLC an Nucleosil 7 C_{18} zu betreiben, ist normale "Reversed-Phase"-Chromatographie(16). Als mobile Phase dient eine Mischung aus 0,05M Ammoniumacetat pH 7,5 (Eluent A) und 0,05M Ammoniumacetat pH 7,5 in Methanol/Wasser 80 : 20 (v/v) (Eluent B).
Die Vorteile dieser Methode liegen in dem hohen Auflösungsvermögen und in der hohen Empfindlichkeit sowie in der Verwendung eines flüchtigen Puffers, so daß die von der Säule eluierten Produkte sofort lyophilisiert werden können und keine Entsalzungsvorgänge an die Elution angeschlossen werden müssen.
Ihr Nachteil liegt darin, daß es vor allem bei komplexen Mischungen schwierig ist, das gewünschte Produkt zu identifizieren. Im Fall der Oligonucleotid-Synthese kann man das Produkt im Bereich der Verbindungen mit der größten Kettenlänge erwarten. Ein weiterer Nachteil ist, daß das System für analytische Fragestellungen zufriedenstellend arbeitet, d.h. von der auf die Nucleosil-Säule aufgetragenen Oligonucleotid-Menge konnten 95% wieder eluiert werden. Überträgt man aber die Bedingungen, die man im analytischen Maßstab gefunden hat, auf den Präparativ-Maßstab, so sind zwei Effekte zu beobachten:

- Die Trennung wird schlechter, das hieß in unserem Fall, daß das Produkt über alle Peaks des Elutionsprofils verteilt war.
- Es wird ein ähnlicher Effekt wie bei der Partisil 10 SAX-Säule beobachtet, daß nämlich nur noch ein Bruchteil der aufgetragenen Substanz wieder von der Säule eluiert werden konnte. Das Produkt blieb in diesem Fall zwar nicht irreversibel auf der Säule haften, sondern konnte mit Methanol/Wasser 80 : 20 (v/v) wieder eluiert werden. Mit dieser Lösung verließen aber auch sämtliche Verunreinigungen, die auf der Säule zurückgehalten wurden, die Säule.

Diese beiden Effekte, die bei den vorliegenden Oligonucleotiden $d(G_4T_4)$ und $d(T_4G_4T_4)$ beobachtet wurden, führen wir auf den verhältnismäßig hohen G-Anteil der Verbindungen zurück. Vor allem die Tatsache, daß es sich um G-Tetramere und nicht um monomere G-Bausteine handelt, läßt auf unspezifische Wechselwirkungen mit dem Säulenmaterial vermuten.

Für den analytischen Säulenlauf mit RP-HPLC wird jeweils ein Aliquot(2,3 bzw. 1,0 A_{260}-Einheiten) der beiden Verbindungen $d(G_4T_4)$ bzw. $d(T_4G_4T_4)$ eingesetzt(Figur 2a, 3a). Die Elution erfolgt isokratisch mit einer Eluentenzusammensetzung von 75% A und 25% B für $d(G_4T_4)$ und von 70% A und 30% B für $d(T_4G_4T_4)$.

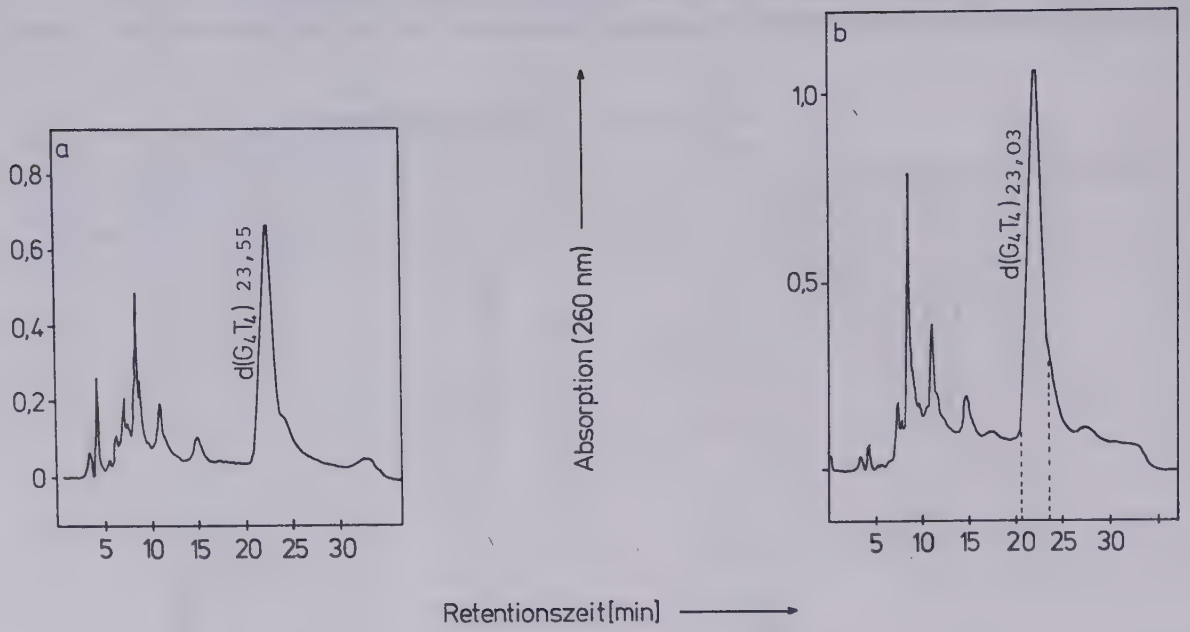
Die Bedingungen und Ergebnisse sind in Tabelle 3 aufgeführt. Im Fall von $d(G_4T_4)$ und $d(T_4G_4T_4)$ erscheinen die Produktpeaks als Hauptpeaks, daneben sind noch kleinere Verunreinigungen zu erkennen, die aber gut abgetrennt werden können.

Die im analytischen Lauf gefundenen Bedingungen werden nun auf die präparative Aufarbeitung der Oligonucleotide mit RP-HPLC übertragen. Trägt man 29 A_{260}-Einheiten $d(G_4T_4)$ auf die Säule auf(Figur 2b), so werden nur noch 22 A_{260}-Einheiten(76%) von der Säule eluiert. Außerdem kann man beobachten, daß nicht nur der Peak mit einer Retentionszeit von 23,03 min $d(G_4T_4)$ entspricht, sondern auch der Peak, der beim anschließenden Waschen der Säule mit 100% B die Säule verläßt, einen hohen $d(G_4T_4)$-Anteil enthält.

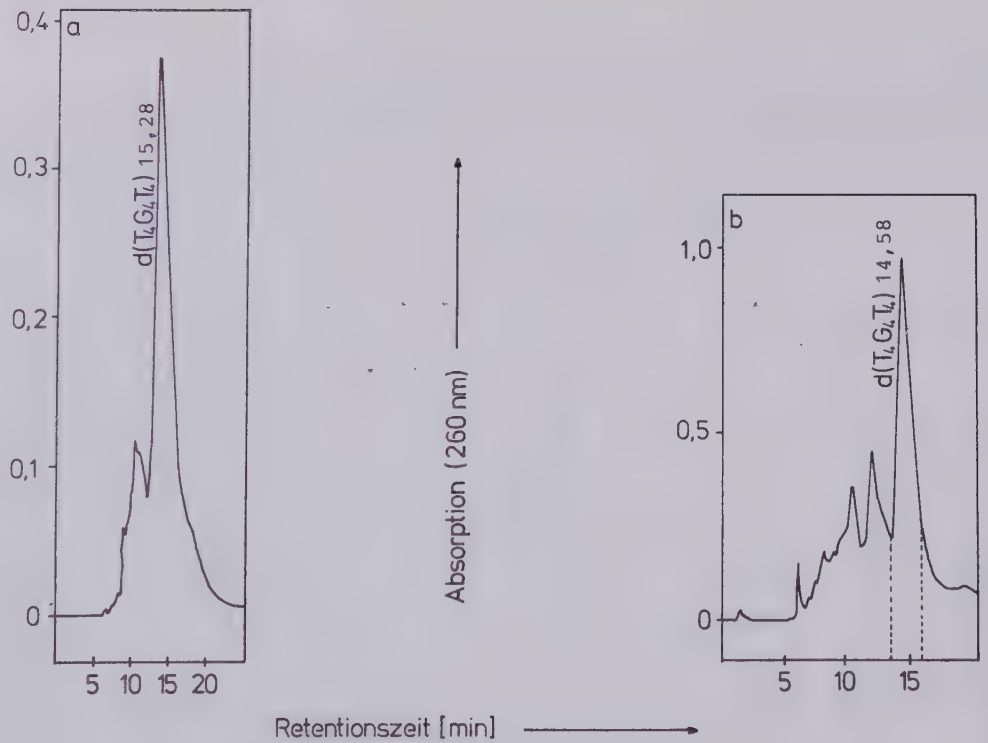
Ähnlich verhält es sich bei der präparativen RP-HPLC von $d(T_4G_4T_4)$. Werden 14 A_{260}-Einheiten auf die Säule aufgetragen (Figur 3b), verlassen nur noch 6,9 A_{260}-Einheiten(49%) die Säule. Das Produkt $d(T_4G_4T_4)$ ist nicht nur in dem Peak mit der Retentionszeit14,58 min zu finden, wie man eigentlich erwarten würde, sondern auch in den Peaks bei 10,97 und bei 12,42 min sowie in dem Peak, der im Waschgang mit 100% B von der Säule eluiert wird.

Um diese Effekte auszuschalten, soll nun versucht werden mit Hilfe der sogenannten Ionenpaar-Chromatographie(16-21), Oligonucleotidgemische im präparativen Maßstab zu reinigen.

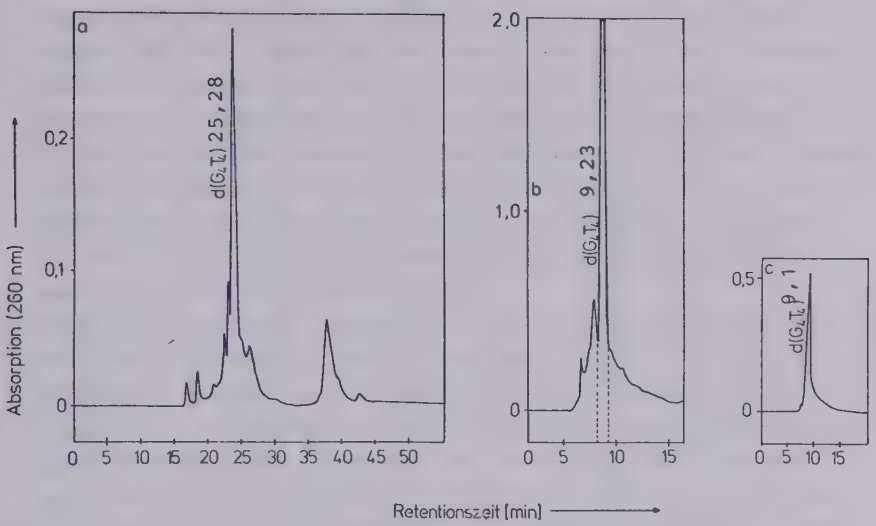
Da viele Substanzen aus dem biochemischen Bereich ionischen



Figur 2: Elutionsprofile der säulenchromatographischen Trennung des Octameren $d(G_4T_4)$
a) 2,3 A_{260}-Einheiten, b) 29,0 A_{260}-Einheiten an reverser Phase (Nucleosil 7 C_{18})
unter isokratischen Bedingungen (Eluentenzusammensetzung: 75% Eluent A, 25% Eluent B)



Figur 3: Elutionsprofile der säulenchromatographischen Trennung des Dodecameren $d(T_4G_4T_4)$
a) 1,0 A_{260}-Einheiten, b) 14,0 A_{260}-Einheiten an reverser Phase (Nucleosil 7 C_{18})
unter isokratischen Bedingungen (Eluentenzusammensetzung: 70% Eluent A, 30% Eluent B)

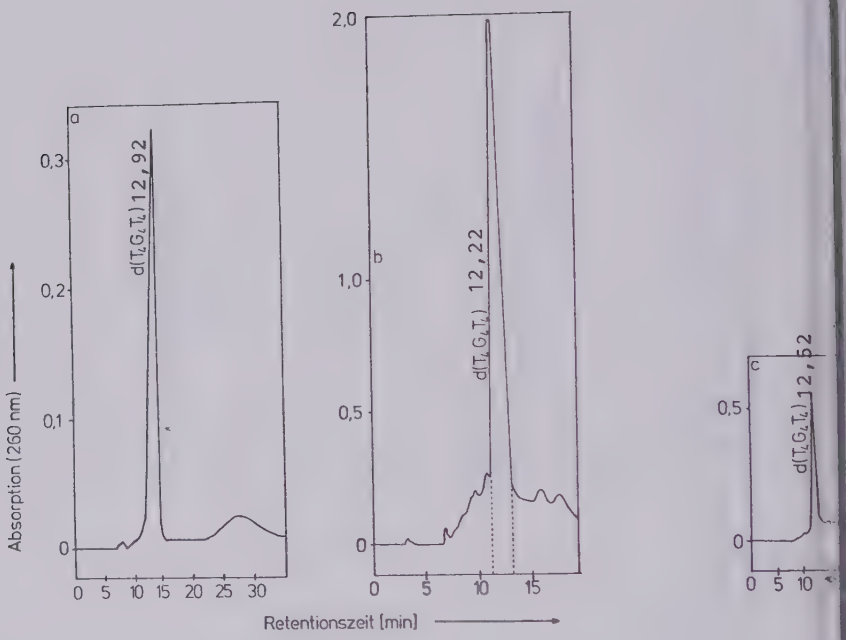


Figur 4: Elutionsprofile der säulenchromatographischen Trennung von $d(G_4T_4)$ mit Hilfe der Ionenpaar-Chromatographie an Nucleosil 7 C_{18}

a) Trennung von 1,5 A_{260}-Einheiten im linear steigenden Gradienten; Säulendimension: 250 x 4,6 mm; Fluß:1 ml/min 1 ml/min.

b) Trennung von 60,0 A_{260}-Einheiten unter isokratischen Bedingungen(Eluentenzusammensetzung: 70% A, 30% B); Säulendimension: 250 x 8,0 mm; Fluß: 2 ml/min.

c) Rechromatographie von 1,2 A_{260}-Einheiten HPLC-gereinigtes $d(G_4T_4)$ unter isokratischen Bedingungen(31% B); die übrigen Bedingungen entsprechen den in b) beschriebenen.



Figur 5: Elutionsprofil der säulenchromatographischen Trennung von $d(T_4G_4T_4)$ mit Hilfe der Ionenpaar-Chromatographie an Nucleosil 7 C_{18} unter isokratischen Bedingungen (Eluentenzusammensetzung: 50% Eluent A, 50% Eluent B)

a) Trennung von 2,5 A_{260}-Einheiten; Säulendimension: 250 x 4,6 mm; Fluß: 1 ml/min.

b) Trennung von 50 A_{260}-Einheiten; Säulendimension: 25o x 8,0 mm; Fluß: 2 ml/min.

c) Rechromatographie von 0,85 A_{260}-Einheiten des HPLC-gereinigten $d(T_4G_4T_4)$ nach den Bedingungen von b).

oder stark polaren Charakter haben, werden sie auf unpolaren, stationären Phasen, wie sie bei der "Reversed-Phase"-HPLC vorliegen, oft nur ungenügend verzögert oder mit unzureichender Selektivität getrennt. Um die Verzögerung geladener, stark hydrophiler Substanzen auf einer unpolaren, stationären Phase erhöhen zu können, werden den mobilen Phasen meist organische Salze, sogenannte Ionenpaar-Reagenzien zugesetzt. Im vorliegenden Fall dient als mobile Phase eine Mischung aus 7,5mM TBA pH 7,0 (Eluent A) und 7,5mM TBA pH 7,0 in Acetonitril/ Wasser 75 : 25 (v/v) (Eluent B).

In geringen Konzentrationen liegen die Ionenpaar-Reagenzien praktisch vollständig dissoziiert vor. Die ionisierten, zu trennenden Komponenten bilden mit den eingesetzten organischen Ionen der Ionenpaar-Reagenzien Ionenpaare, welche sich chromatographisch ähnlich verhalten wie ungeladene Verbindungen. Die Retention der zu untersuchenden, ionischen Verbindungen in der Ionenpaar-Chromatographie ist abhängig von der Stärke ihrer Bindung als Ionenpaar an die stationäre Phase. Auf diese Art und Weise ist es gelungen, präparative Mengen von Oligonucleotidgemischen mit Hilfe der HPLC zu reinigen.

Das Vorgehen zum Auffinden der optimalen Trennbedingungen ist wie folgt:

Zuerst werden an einer analytischen Säule (250 x 4,6 mm) mit kleinen Mengen der beiden Oligonucleotide ($d(G_4T_4)$: 1,5 A_{260}-Einheiten; $d(T_4G_4T_4)$: 2,5 A_{260}-Einheiten) die Bedingungen für eine isokratische Elution gesucht.Für das Octamere $d(G_4T_4)$ werden die isokratischen Bedingungen anhand eines linearen Gradienten mit einer Zusammensetzung von 10 - 60% B ermittelt. Der Produktpeak erscheint als Hauptpeak mit einer Retentionszeit von 25,28 min(Figur 4a).

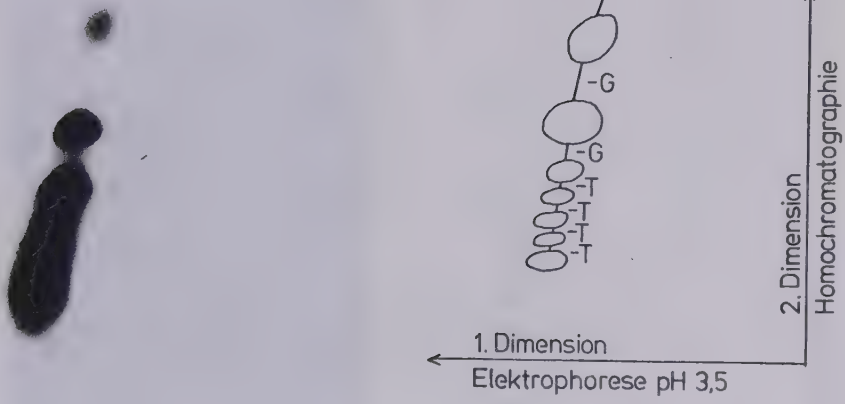
In den nachfolgenden, präparativen Läufen werden bis zu 60 A_{260}-Einheiten des Octameren $d(G_4T_4)$ auf die Säule aufgetragen und isokratisch mit 30% B eluiert. Die Elutionslösung enthält dabei 91% der aufgetragenen Oligonucleotidmenge. Die innerhalb der senkrechten Strichelung liegenden Fraktionen werden entsalzt und lyophilisiert(Figur 4b).

Ein Aliquot des Lyophilisats (1,2 A_{260}-Einheiten) wird zur

Überprüfung der Reinheit rechromatographiert. Man findet nur noch einen Peak, d.h. das Octamere $d(G_4T_4)$ liegt nach der HPLC-Reinigung als chromatographisch reine Substanz vor.(Figur 4c) Das Gleiche gilt auch für das Dodecamere $d(T_4G_4T_4)$. Im analytischen Lauf werden 2,5 A_{260}-Einheiten bei 50% B chromatographiert(Figur 5a). Die Wiederfindungsrate beträgt 99%.
In mehreren präparativen Läufen werden bis zu 50 A_{260}-Einheiten des Dodecameren $d(T_4G_4T_4)$ chromatographisch gereinigt (Figur 5b).
Es können noch einige kleine Verunreinigungen abgetrennt werden, doch kann man sagen, daß das Dodecamere nach der Chromatographie an DEAE-Cellulose schon ein sehr sauberes Produkt ist. Die Elutionsausbeute beträgt hier 96%. Die Fraktionen innerhalb der senkrechten Strichelung werden vereinigt, entsalzt und lyophilisiert.
Vom Octameren $d(G_4T_4)$ können ca. 100 mg, vom Dodecameren $d(T_4G_4T_4)$ ca. 300 mg in chromatographisch reiner Form isoliert werden.

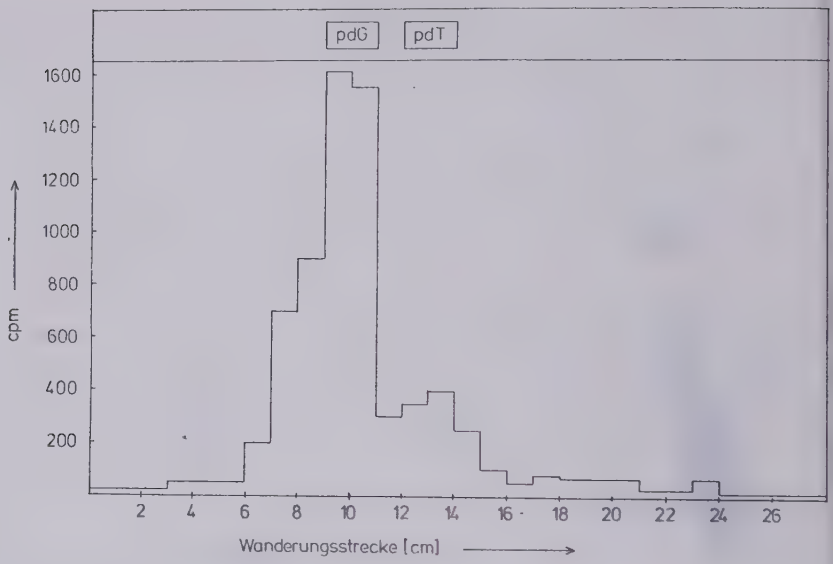
1.7 Identifizierung der Oligonucleotide $d(G_4T_4)$ und $d(T_4G_4T_4)$ nach der Fingerprintmethode

Mit Hilfe der Homochromatographie und der zweidimensionalen Fingerprinttechnik(37, 38) werden sowohl die Reinheit als auch die Sequenz der beiden Oligonucleotide $d(G_4T_4)$ und $d(T_4G_4T_4)$ bewiesen. Hierzu werden 0,1 bis 0,01 A_{260}-Einheiten der beiden Syntheseprodukte an der 5'terminalen Hydroxylgruppe unter Anwendung von $[\gamma^{32}P]$ATP und dem Enzym PNK phosphoryliert und dann homochromatographiert. Dabei wird der Kinase-Ansatz in verschiedenen Größenordnungen durchgeführt.
Werden 0,01 A_{260}-Einheiten des zu markierenden Oligonucleotids eingesetzt, erfolgt die Aufarbeitung homochromatographisch; setzt man 0,1 A_{260}-Einheiten bei der Kinase-Reaktion ein, wird der Reaktionsansatz mit Hilfe einer Borsäure-Gel-Säule(44, 45) aufgearbeitet. Diese Art der Aufarbeitung bietet den Vorteil, daß die Carrier-RNA, die beim Ansatz mit 0,01 A_{260}-Einheiten

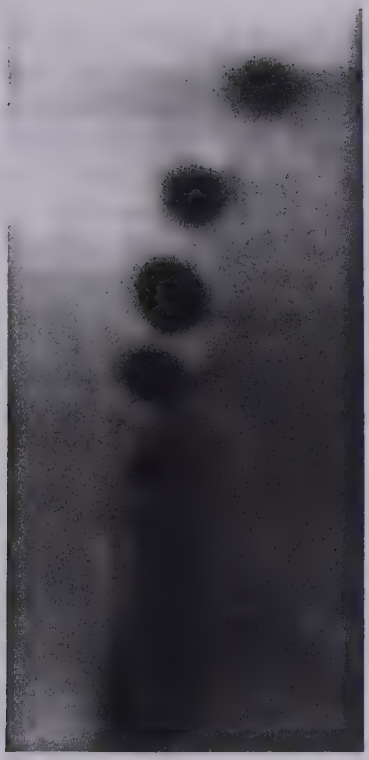


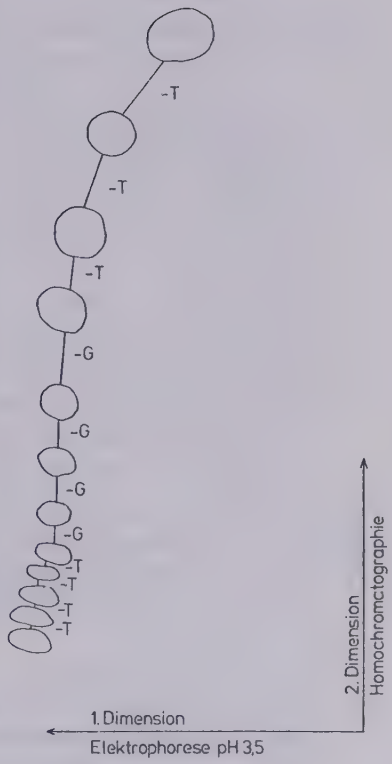
Figur 6: a) Autoradiogramm nach der zweidimensionalen Auftrennung von $[^{32}P]d(G_4T_4)$. Die Partialhydrolysate werden in der 1. Dimension durch Elektrophorese auf Cellulose-Acetat-Streifen bei pH 3,5, in der 2. Dimension homochromatographisch aufgetrennt (Homomix VI).

b) Interpretation des Autoradiogramms. Aus dem Gang der auftretenden Flecken ergibt sich die Sequenz zu $(N\text{-}G_3T_4)$.



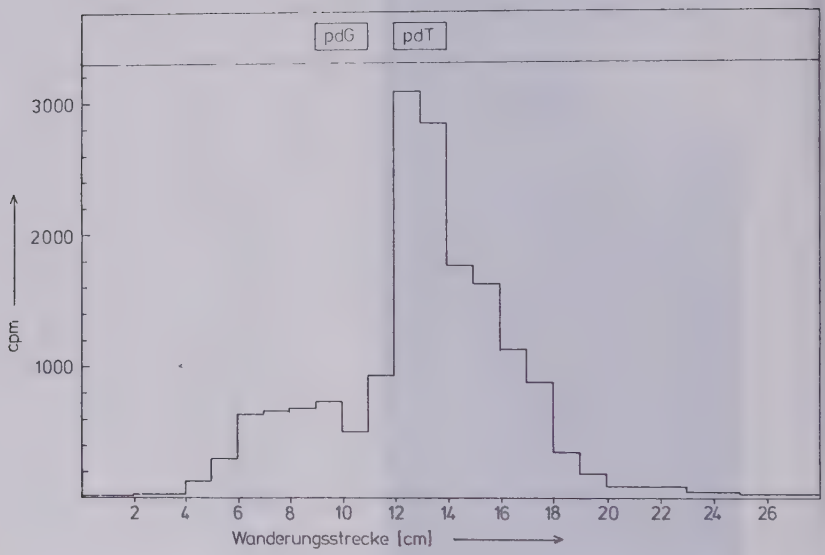
Figur 6c: Endgruppenbestimmung von $d(G_4T_4)$ durch Papierelektrophorese.
Durch Vergleich mit den beiden Nucleotiden pdT und pdG wird der 5'terminale Baustein als $[^{32}P]$pdG identifiziert.





Figur 7: a) Autoradiogramm nach der zweidimensionalen Auftrennung der Partialhydrolysate von $[^{32}P]d(T_4G_4T_4)$ Die Partialhydrolysate werden in der 1. Dimension durch Elektrophorese auf CA-Streifen bei pH 3,5, in der 2. Dimension homochromatographisch aufgetrennt (Homomix II/III).

b) Interpretation des Autoradiogramms. Aus dem Gang der auftretenden Flecken ergibt sich die Sequenz zu $(N\text{-}T_3G_4T_4)$.



Figur 7c: Endgruppenbestimmung von d($T_4G_4T_4$) durch Papierelektrophorese.
Durch Vergleich mit den beiden Nucleotiden pdT und pdG wird der 5'terminale Baustein als [^{32}P]pdT identifiziert.

zum Oligonucleotid hinzukommt, hier nicht vorhanden ist. Als Folge davon wird der Enzymverbrauch beim nachfolgenden Partialabbau des Oligonucleotids mit Phosphodiesterase aus Schlangengift herabgesetzt.

Für $[^{32}P](G_4T_4)$ wird Homomix VI, für $[^{32}P](T_4G_4T_4)$ Homomix II/III angewandt. In beiden Fällen kann man im Autoradiogramm einheitliche Banden feststellen. Die im Autoradiogramm auftretenden, schwächeren Banden sind auf geringe Abbauaktivitäten des Enzyms zurückzuführen.

Zur Überprüfung der Kettenlänge der Produkte werden die isolierten, radioaktiv markierten Oligonucleotide mit Phosphodiesterase aus Schlangengift partiell hydrolysiert und das Partialhydrolysat homochromatographisch überprüft. Dabei haben wir festgestellt, daß der Puffer für die Reaktion mit PDE aus Schlangengift, wie er in der Literatur(28) beschrieben ist, nicht erforderlich ist, lediglich 5 ul 0,01M $MgCl_2$ muß zugesetzt werden. Dies hat den Vorteil, daß bei der nachfolgenden Hochspannungselektrophorese weniger Salz in den Proben vorhanden ist und die Proben vom CA-Streifen besser aufgenommen werden.

Man findet im Autoradiogramm des Octanucleosidphosphats die erwarteten acht, im Autoradiogramm des Dodecanucleosidphosphats die erwarteten zwölf Abbauprodukte, die beim schrittweisen enzymatischen Abbau der beiden Verbindungen vom 3'-Ende her entstehen müssen.

Die Sequenz der beiden Syntheseprodukte wird durch zweidimensionale Auftrennung, Hochspannungselektrophorese auf CA-Streifen in der ersten Dimension, Homochromatographie auf DEAE-Cellulose in der zweiten Dimension, ermittelt.

Aus dem Gang der im Autoradiogramm auftretenden Flecken lassen sich als Sequenzen $d(N\text{-}G_3T_4)$ für das Octamere, $d(N\text{-}T_3G_4T_4)$ für das Dodecamere bestimmen.

Um die im Obigen mit N bezeichneten 5'terminalen Bausteine bestimmen zu können, bedient man sich der Hochspannungspapierelektrophorese. Eine Mischung der Nucleotide pdT und pdG sowie die jeweils vom letzten Fleck des Autoradiogramms eluierte Aktivität werden papierelektrophoretisch aufgetrennt.

Indem man die Wanderungsstrecke der beiden Referenznucleotide mit den Wanderungsstrecken der Aktivität vergleicht, läßt sich der 5'terminale Baustein der beiden Produkte ermitteln.
Danach lauten die vollständigen Sequenzen für das Octanucleosidheptakisphosphat $d(G_4T_4)$ und für das Dodecanucleosidundecakisphosphat $d(T_4G_4T_4)$.
Nachdem es gelungen ist, sowohl das Octanucleosidheptakisphosphat $d(G_4T_4)$ als auch das Dodecanucleosidundecakisphosphat $d(T_4G_4T_4)$ in präparativen Mengen und chromatographisch reiner Form darzustellen, soll nun die Blockkondensation von Oligonucleotiden mit Hilfe enzymatischer Reaktionen untersucht werden.

2. Blockweise Verlängerung mit Hilfe des Enzyms T_4-DNA-Ligase

Die T_4-DNA-Ligase ist in der Lage, offene Phosphodiesterbindungen in doppelsträngigen DNA-Molekülen und Fragmenten zu schließen(30-33). Diese Aktivität macht man sich bei der Synthese von Genen zunutze, um aus kurzen DNA-Fragmenten doppelsträngige, längere DNA-Bereiche aufzubauen. Hierzu gibt es zwei Wege. Der eine Weg ist die Verknüpfung von Fragmenten mit "sticky ends", der andere ist die "blunt-end"-Ligation.

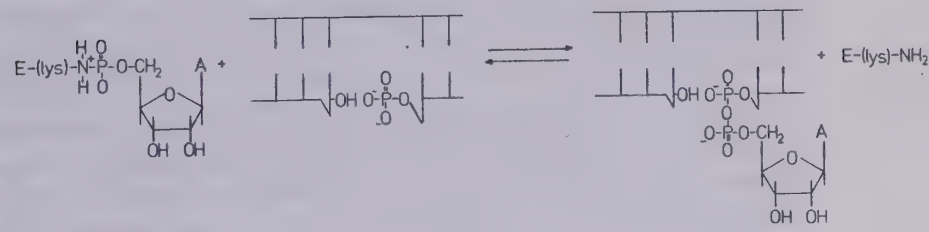
sticky end (d.h. kein Überhang)	$^{5'}C_4A_4C_4{}^{3'}$ $^{3'}G_4T_4G_4p^{5'}$	+ $^{5'}pA_4C_4{}^{3'}$ $^{3'}T_4G_4{}^{5'}$
blunt end (d.h. Einzelstrang-überhang)	$^{5'}C_4A_4C_4{}^{3'}$ $^{3'}G_4T_4G_4T_4p^{5'}$ +	$^{5'}pA_4C_4A_4C_4{}^{3'}$ $^{3'}G_4T_4G_4{}^{5'}$

Um also Oligonucleosidphosphate, d.h. einzelsträngige DNA-Fragmente, miteinander verknüpfen zu können, muß man sie zuerst in Doppelstrang-DNA-Fragmente überführen. Praktisch macht

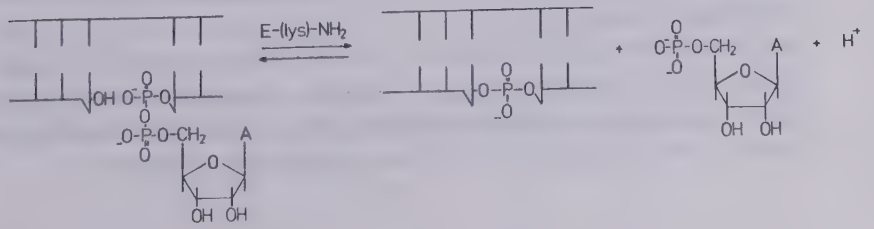
man das so, daß man dem Acceptor-Molekül mit freiem 3'OH-Ende und dem Donor-Molekül mit 5'Phosphat-Ende das komplementäre DNA-Fragment als "Brücke" zur Verfügung stellt.
Um eine Phosphodiesterbindung zu knüpfen, benutzt das Enzym T_4-DNA-Ligase die Hydrolyse-Energie von ATP. Die Verknüpfung zweier DNA-Fragmente verläuft in drei Schritten(30).

a) Kovalenter Transfer der Adenylyl-Gruppierung des ATP auf eine ϵ-Aminogruppe des Lysin-Restes in der Aminosäurekette des Enzyms unter gleichzeitiger Eliminierung von PP_j.

b) Aktivierung des 5'Phosphat-Endes der "sticky"-DNA durch Übertragung der Adenylyl-Gruppe vom Enzym auf die 5' Phosphoryl-Gruppe, wobei eine neue Pyrophosphat-Gruppe gebildet wird



c) Bildung der Phosphodiester-Bindung durch nukleophilen Angriff der terminalen 3'OH-Gruppe des Acceptor-Moleküls auf die aktivierte 5'Phosphoryl-Gruppe des Donors. Dabei wird gleichzeitig AMP freigesetzt.



Mit Hilfe der T_4-DNA-Ligase soll in der vorliegenden Arbeit aus drei Dodecameren und dem komplementären Eikosamer das doppelsträngige Fragment (A) aufgebaut werden, aus dem durch Tempern möglicherweise die terminale inverted-repeat-Sequenz(B) der DNA hypotricher Ciliaten resultieren kann:

A $\quad {}^{5'}G_4T_4G_4{}^{3'} + {}^{5'}pT_4G_4T_4{}^{3'} + {}^{5'}pG_4T_4G_4{}^{3'}$

$\qquad\quad {}^{3'}C_4\text{——}A_4C_4A_4\text{——}C_4{}^{5'}$

B $\quad {}^{5'}G_4T_4G_4T_4G_4T_4G_4T_4G_4{}^{3'}$

$\qquad\quad\;\; {}^{3'}C_4A_4C_4A_4C_4{}^{5'}$

Als Acceptor wird das 12mer $d(G_4T_4G_4)$ verwendet. Die beiden übrigen 12mere $d(T_4G_4T_4)$ und $d(G_4T_4G_4)$ dienen als Donatoren, nachdem sie mit Hilfe des Enzyms PNK und ATP, welchem ein geringer Anteil an $[^{32}P]$ATP zugesetzt ist, am 5' Ende phosphoryliert sind. Nach der Kinase-Reaktion werden die phosphorylierten Verbindungen über eine Borsäuregel-Säule gereinigt. Als Brücke dient das von H. Ruess synthetisierte $d(C_4A_4C_4A_4C_4)$

Ansätze und Reaktionsbedingungen sind in Tabelle 4 beschrieben. Der Reaktionsansatz wird nach Ablauf der Reaktionszeit konzentriert und in Auftragepuffer für die Gelelektrophorese gelöst. Die Lösung wird 5 min auf 90 °C erhitzt, um die Wechselwirkungen zwischen den beiden DNA-Einzelsträngen aufzuheben. Nach Abkühlen auf RT wird die Mischung auf ein 20% PAA-Gel aufgetragen und bei 2400 V unter denaturierenden Bedingungen elektrophoretisiert(34). Auf der anschließenden Autoradiographie lassen sich die Produkte sehr gut von den Ausgangsverbindungen unterscheiden. Die Interpretation des Autoradiographiefilms liefert folgende Aussage:

Als Hauptprodukt der Reaktion 1 (Tabelle 4) entstehen Verbindungen der Kettenlänge 24, ein Produkt der Kettenlänge 36 tritt nicht auf. Dies bedeutet, daß zwei Dodecamere miteinander reagieren, die Kondensation der neu entstandenen 24mere

$d(G_4T_4G_4T_4G_4T_4)$ oder $pd(T_4G_4T_4G_4T_4G_4)$mit einem weiteren Dodecameren erfolgt unter den gewählten Bedingungen nicht.Als Erklärung dafür, daß keine Weiterreaktion erfolgt, muß man annehmen, daß folgende Kondensationen bevorzugt stattfinden:

$$\begin{array}{l} 5'\,G_4T_4G_4\,3' + {}^{5'}pT_4G_4T_4\,{}^{3'} \\ 3'\,C_4A_4C_4 \text{——} A_4C_4\,5' \end{array}$$

oder

$$\begin{array}{l} {}^{5'}pT_4G_4T_4\,{}^{3'} + {}^{5'}pG_4T_4G_4\,{}^{3'} \\ \quad 3'\,C_4A_4 \text{————} C_4A_4C_4\,5' \end{array}$$

Da sich das gewünschte 36mere $d(G_4T_4G_4T_4G_4T_4G_4T_4G_4)$ durch Ligase-Reaktion nicht darstellen läßt, wird versucht, das 36er Fragment aus anderen Teilstücken mit Hilfe der T_4-DNA-Ligase darzustellen. Zunächst aber wird geklärt, welche synthetischen Oligonucleotide sowohl als Acceptoren als auch als Donatoren verwendbar sind. Als Acceptoren sollen $d(G_4T_4)$ und $d(T_4G_4T_4)$ sowie die von R. Semmler synthetisierten Oligonucleotide $d(T_4G_4)$, $d(G_4T_4G_4)$ und $d(T_4G_4T_4G_4)$(27) eingesetzt werden.

Die gleichen Verbindungen sollen als Donatoren dienen, wobei die 5'terminale OH-Gruppe enzymatisch phosphoryliert wurde. Die Ergebnisse der einzelnen Reaktionen lassen sich wie folgt interpretieren: Werden jeweils ein Acceptor und ein Donator eingesetzt, so findet man in der Regel das erwartete Kondensationsprodukt als Hauptprodukt. Die Kondensation der beiden Octamere $d(pT_4G_4)$ und $d(pG_4T_4)$ mit sich selbst (Tabelle 4, Reaktion 9, 10) liefert als Hauptprodukt die beiden Hexadecamere $d(T_4G_4T_4G_4)$ (Figur 8, Bahn 1) und $d(G_4T_4G_4T_4)$(Figur 8, Bahn 2). Als Nebenprodukte findet man Verbindungen der Kettenlänge 24 und 32, die als Verlängerungsprodukte der Hexadecameren angesehen werden können.
Reagieren die Octameren mit den Dodecameren(Tabelle 4, Reaktion 7, 8) so findet man fast ausschließlich die erwarteten

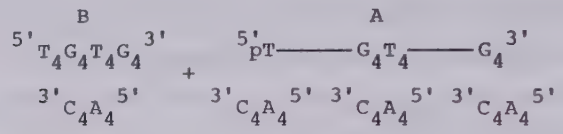
Eikosamere $d(T_4G_4T_4G_4T_4)$(Figur 8, Bahn 5) und $d(G_4T_4G_4T_4G_4)$ (Figur 8, Bahn 6). Werden aber die Dodecamere bei der Kondensation mit den Octameren als Acceptoren eingesetzt(Tabelle 4 Reaktion 5, 6), findet man Hexadecamere als Nebenprodukte (Figur 8, Bahn 3, 4). Diese Tatsache läßt sich nur so erklären, daß die Octameren aufgrund ihrer freien 3'OH-Gruppe auch als Acceptor auftreten können und deshalb befähigt sind, mit sich selbst zu reagieren, was allerdings nur durch die repeat-Sequenz möglich ist.
Die beiden Dodecamere $pd(T_4G_4T_4)$ und $pd(G_4T_4G_4)$besitzen zwar auch freie 3'OH-Gruppen, eine Reaktion dieser beiden Verbindungen mit sich selbst ist aber aufgrund der gewählten Brückenverbindung $d(C_4A_4C_4A_4C_4)$ nicht möglich.
Will man aber einen Acceptor mit zwei verschiedenen Donatoren verknüpfen, wie es auch im Fall der Darstellung des 36meren $d(G_4T_4G_4T_4G_4T_4G_4T_4G_4)$ versucht wurde, so findet man kein einheitliches Hauptprodukt mehr, sondern ein breites Produktspektrum. Betrachtet man die Reaktion $d(G_4T_4G_4)$ + $pd(T_4G_4)$ + $pd(T_4G_4T_4)$(Reaktion 12, Tabelle 4), so besitzen die auftretenden Produkte die Kettenlängen 16, 20, 24(Figur 8, Bahn 10). Das Hexadecamere kann nur aus der Reaktion von $pd(T_4G_4)$ entstanden sein und hat daher die Sequenz $pd(T_4G_4T_4G_4)$. Für die Entstehung des 20meren kommen zwei mögliche Kondensationen in Frage. Zum einen kann das 20mere $d(G_4T_4G_4T_4G_4)$ aus der Ligation von $d(G_4T_4G_4)$ mit $pd(T_4G_4)$ entstehen, bei der Reaktion von $pd(T_4G_4)$ mit $pd(T_4G_4T_4)$ kann sich zum andern das 20mere $pd(T_4G_4T_4G_4T_4)$ bilden. Das 24mere $d(G_4T_4G_4T_4G_4T_4)$ entsteht aus der Reaktion von $d(G_4T_4G_4)$ mit $pd(T_4G_4T_4)$.
Das prinzipiell gleiche Ergebnis findet man bei der Reaktion $d(T_4G_4T_4)$ + $pd(G_4T_4)$ + $pd(G_4T_4G_4)$(Tabelle 4, Reaktion 11; Figur 8, Bahn 9).
Werden für die Ligase-Reaktion nur Dodecamere eingesetzt (Tabelle 4, Reaktion 1, 2), so bilden sich zwar 24mere als

Hauptprodukt; man muß aber davon ausgehen, daß es sich um Produktgemische handelt(Figur 8, Bahn 11, 12).
Spielt das Hexadecamere die Rolle des Acceptors(Tabelle 4, Reaktion 15, 16, 17), entstehen im Normalfall die erwarteten Produkte. Bei der Reaktion des Hexadecameren $d(T_4G_4T_4G_4)$ mit dem Octameren $d(pT_4G_4)$(Tabelle4, Reaktion 15) findet man neben dem erwarteten 24meren $d(T_4G_4T_4G_4T_4G_4)$ noch ein neues Hexadecameres, $pd(T_4G_4T_4G_4)$(Figur 8, Bahn 14), welches wieder aus der Kondensation des Octameren mit sich selbst entstanden sein kann.
Spielt das Hexadecamere gleichzeitig die Rolle des Acceptors und des Donors, liefert die Ligase-Reaktion kein neues Produkt(Tabelle 4, Reaktion 17; Figur 8, Bahn 17).
Diese Tatsache läßt sich so erklären, daß die Brückenverbindung $d(C_4A_4C_4A_4C_4)$ mit dem Donor, dem Acceptor oder der neu Verbindung derart in Wechselwirkung tritt, daß die größtmögliche Zahl an Basenpaarungen über Wasserstoffbrückenbindungen eintritt. Wenn jetzt das Hexadecamere $d(T_4G_4T_4G_4)$ mit der Brückenverbindung $d(C_4A_4C_4A_4C_4)$ in Wechselwirkung tritt, wird sich für die Ligase-Reaktion folgendes Bild ergeben:

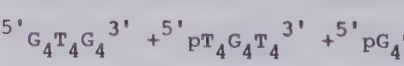
Acceptor		Donor
$^{5'}T_4G_4T_4G_4{}^{3'}$	+	$^{5'}pT_4G_4T_4G_4{}^{3'}$
$^{3'}C_4A_4C_4A_4C_4{}^{5'}$		$^{3'}C_4A_4C_4A_4C_4{}^{5'}$

Durch den C_4-Überhang am Donator-Molekül und das "blunt-ended"-Acceptor-Molekül ist keine Reaktion möglich.
Die beiden Hexadecamere $d(T_4G_4T_4G_4)$ und $pd(T_4G_4T_4G_4)$ kondensieren auch dann nicht, wenn als Brücke $d(A_4C_4)$ anstelle von $d(C_4A_4C_4A_4C_4)$ verwendet wird und die Konzentration von $d(A_4C_4)$ vom 100fachen Überschuß bis zum 100fachen Unterschuß bezogen auf die Donor/Acceptor-Konzentration variiert wird(Tabelle 4, Reaktion 18; Figur 8, Bahn 18).
Die Kondensation gelingt aber auf folgendem Weg: Man bereitet sich zwei Lösungen, die beide äquimolare Mengen des Hexadeca-

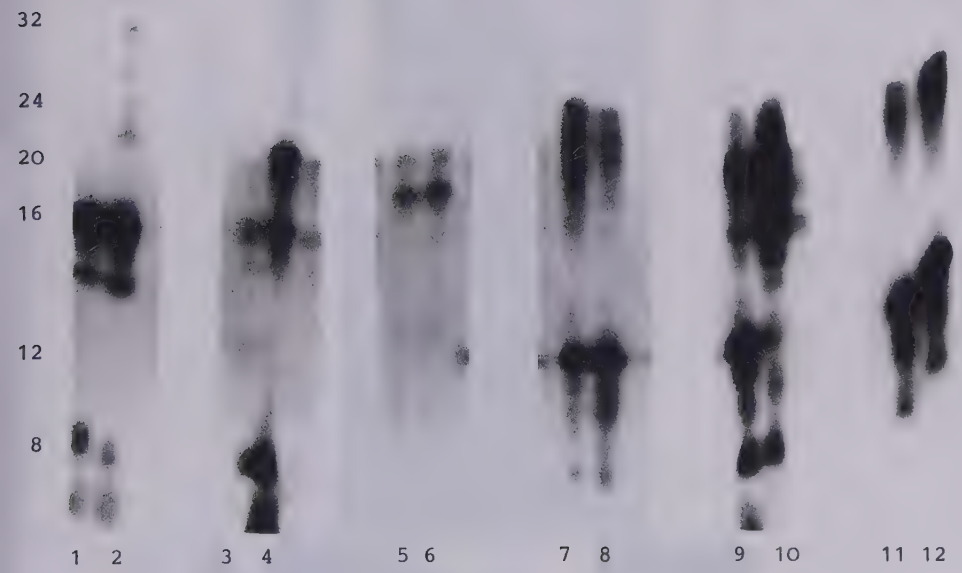
meren und unterschiedliche Mengen an $d(A_4C_4)$ enthalten. Lösung A enthält den Komplementärstrang $d(A_4C_4)$ im dreifachen molaren Überschuß. In der Donatorlösung B ist die Konzentration des Komplementärstrangs gleich der Konzentration an Hexadecamerem $pd(T_4G_4T_4G_4)$.



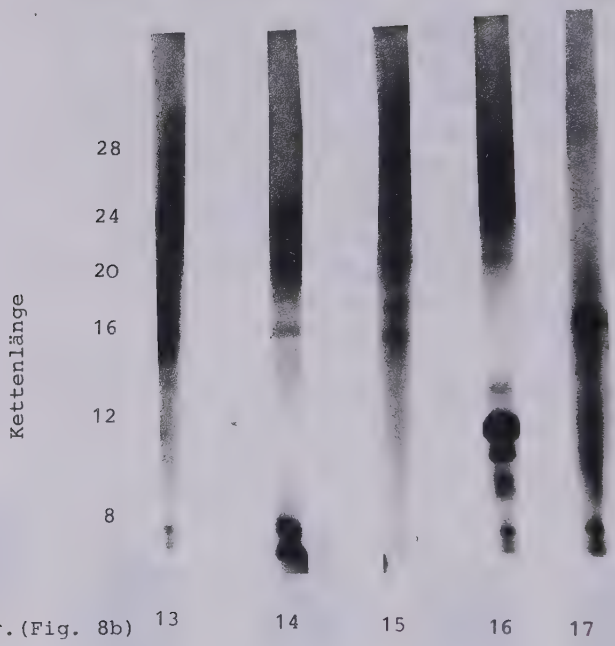
Die Ligaseansätze zur Darstellung des 32meren $d(T_4G_4T_4G_4T_4G_4T_4G$ werden in drei verschiedenen Konzentrationsverhältnissen (1 A : 10 B, 1 A : 1 B, 10 A : 1 B) bei 4 °C und bei 20 °C durchgeführt (Tabelle 4, Reaktion 19a,b,c). Figur 8 zeigt, daß die Reaktionen bei 4 °C das erwartete Kondensationsprodukt, das 32mere $d(T_4G_4T_4G_4T_4G_4T_4G_4)$ entstehen lassen. (Figur 8, Bahn 19, 21, 23). Bei 20 °C entsteht das erwartete Produkt nur in Spuren (Figur 8, Bahn 20, 22, 24).
Verfährt man mit dem mittleren Baustein des 36meren, $pd(T_4G_4T_4)$ in gleicher Weise, d.h. tempert man die Verbindung unter Zugabe äquimolarer Mengen der Brückenverbindung $d(C_4A_4C_4A_4C_4)$ bei 4 °C und setzt sie dann mit äquimolaren Mengen der beiden Oligonucleotide $d(G_4T_4G_4)$ und $pd(G_4T_4G_4)$ um, so erhält man das 36mere $d(G_4T_4G_4T_4G_4T_4G_4T_4G_4)$ in geringen Ausbeuten neben einem größeren Anteil $d(G_4T_4G_4T_4G_4T_4)$ (Figur 8, Bahn 26, 27). (Reaktion 20, Tabelle 4)



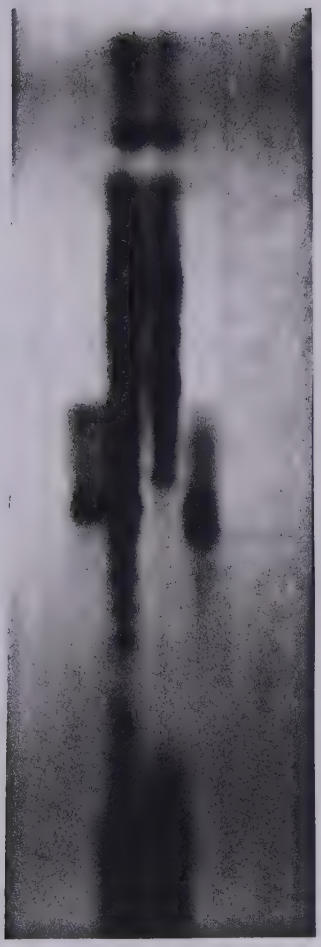
Figur 8a: Autoradiographien der gelelektrophoretischen Auftrennung der Ligase-Reaktionen (Tabelle 4), die in Figur 8b schematisch dargestellt sind.
Die Ligase-Ansätze wurden über 20%ige PAA-Gele aufgetrennt; Geldimension: 20 x 40 x 0,025 cm.
Es wird so lange bei 2400 V elektrophoretisiert, bis der erste blaue Marker (Bromphenolblau) ungefähr die Hälfte des Gels durchlaufen hat.
Die Nummerierung der Ligase-Reaktionen entspricht der Nummerierung in Figur 8b.



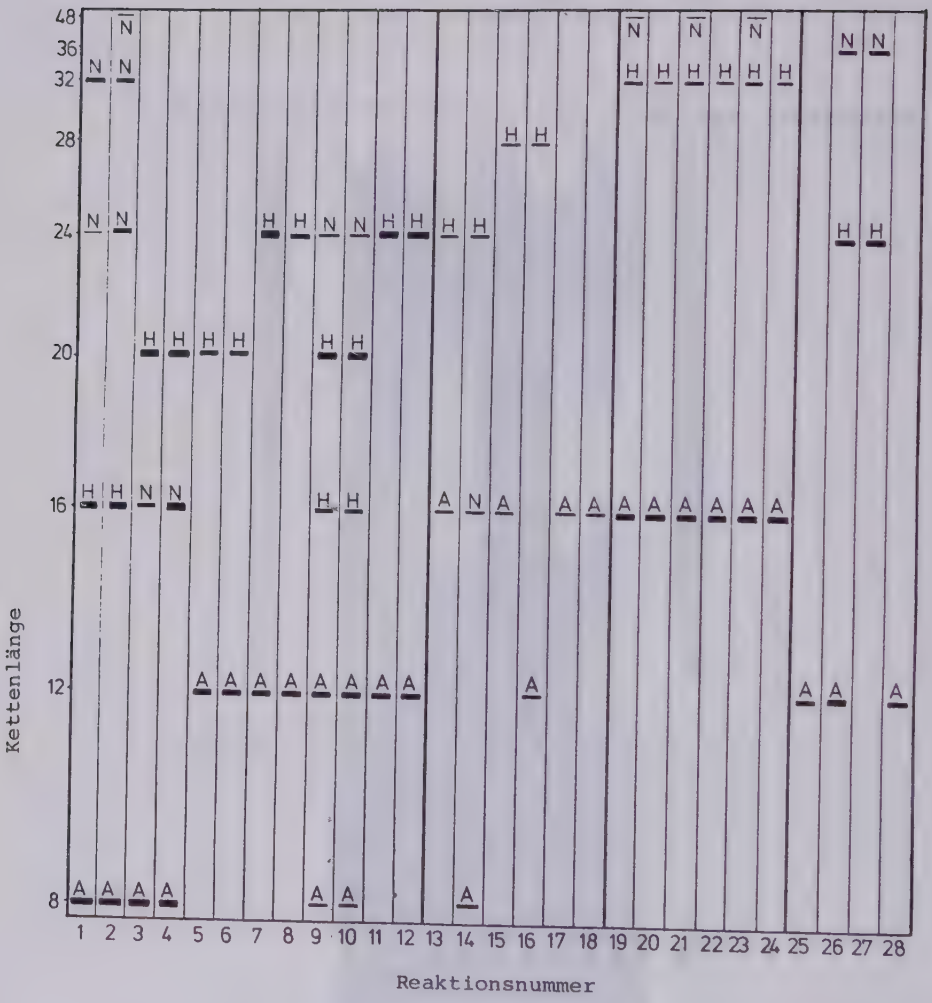
Fortsetzung Figur 8a:



Fortsetzung Figur 8a:



Nr.(Figur 8b) 25 26 27 28



Figur 8b: Schematische Darstellung der gelelektrophoretischen Fraktionierung der Ligase-Reaktionen. Eingezeichnet sind nur die Ausgangsverbindungen(A) sowie die Haupt(H)- und Nebenprodukte(N), wie sie auf den Autoradiographiefilmen zu sehen sind. Abbauprodukte bleiben der Übersichtlichkeit wegen unberücksichtigt.

Tabelle 4: Bedingungen und Ergebnisse bei der enzymatischen Blockkondensation von Oligodesoxynucleotiden mit Hilfe der T_4-DNA-Ligase. Zur Kondensation der Acceptoren und Donoren aus den Ansätzen 1 - 17 wird das komplementäre Polynucleotid $d(C_4A_4C_4A_4C_4)$ im fünffachen molaren Überschuß verwendet. Die Reaktion 18 wird mit dem komplementären Octameren $d(A_4C_4)$ durchgeführt, wobei das molare Verhältnis von Acceptor/Donator zur Brückenverbindung 100 : 1, 10 : 1, 1 : 1, 1 : 10 und 1 : 100 variiert wird. Bei Reaktion 19 besteht die Komponente A aus $d(T_4G_4T_4G_4)$ mit einem dreifachen Überschuß an $d(A_4C_4)$, Komponente B besteht aus $pd(T_4G_4T_4G_4)$ und $d(A_4C_4)$ im molaren Verhältnis 1 : 1; die Konzentration an $(p)d(T_4G_4T_4G_4)$ ist in beiden Komponenten gleich groß. Durch Mischen der beiden Komponenten ergeben sich die drei verschiedenen Ansätze. Bei Reaktion 20 wird $pd(T_4G_4T_4)$ unter Zusatz equimolarer Mengen der Brückenverbindung $d(C_4A_4C_4A_4C_4)$ getempert und mit equimolaren Mengen der Oligonucleotide $d(G_4T_4G_4)$ und $pd(G_4T_4G_4)$ umgesetzt. Alle Kondensationen werden bei 4 °C und 20 °C durchgeführt.

Nr.	Ligase-Ansatz								
	Acceptor		Donator		Enzym	Zeit	Kondensationsprodukte		Figur 8
	A_{260}-Einh.	(pmol)	A_{260}-Einh.	(pmol)	(U)	(h)	Hauptprodukte	Nebenprodukte	Bahn
1	$d(G_4T_4G_4)$	+	$pd(T_4G_4T_4)$		o,o3	24	$d(G_4T_4G_4T_4G_4T_4)$		12
	o,1o	83o	o,1o	83o			$pd(T_4G_4T_4G_4T_4G_4)$		12
		+	$pd(G_4T_4G_4)$						
			o,1o	83o					
2	$d(T_4G_4T_4)$	+	$pd(G_4T_4G_4)$		o,o3	24	$d(T_4G_4T_4G_4T_4G_4)$		11
	o,1o	83o	o,1o	83o			$pd(G_4T_4G_4T_4G_4T_4)$		11
		+	$pd(T_4G_4T_4)$						
			o,1o	83o					
3	$d(T_4G_4T_4)$	+	$pd(G_4T_4G_4)$		o,o2	18	$d(T_4G_4T_4G_4T_4G_4)$		7
	o,1o	83o	o,1o	83o					

Nr.	Ligase-Ansatz Acceptor A_{260}-Einh.	(pmol)	Donator A_{260}-Einh.	(pmol)	Enzym (U)	Zeit (h)	Kondensationsprodukte Hauptprodukte	Nebenprodukte	Figur 8 Bahn
4	$d(G_4T_4G_4)$		+ $pd(T_4G_4T_4)$		o,o2	18	$d(G_4T_4G_4T_4G_4T_4)$		8
	o,o8	65o	o,o8	65o					
5	$d(T_4G_4T_4)$		+ $pd(G_4T_4)$		o,o1	18	$d(T_4G_4T_4G_4T_4)$		3
	o,o2	13o	o,o15	12o				$pd(G_4T_4G_4T_4)$	3
6	$d(G_4T_4G_4)$		+ $pd(T_4G_4)$		o,o1	18	$d(G_4T_4G_4T_4G_4)$		4
	o,o1	12o	o,o15	12o				$pd(T_4G_4T_4G_4)$	4
7	$d(T_4G_4)$		+ $pd(T_4G_4T_4)$		o,o2	17	$d(T_4G_4T_4G_4T_4)$		5
	o,o5	625	o,o75	625				Abbauprodukte	
8	$d(G_4T_4)$		+ $pd(G_4T_4G_4)$		o,o1	17	$d(G_4T_4G_4T_4G_4)$		6
	o,o15	12o	o,o2	13o				Abbauprodukte	
9	$d(T_4G_4)$		+ $pd(T_4G_4)$		o,o2	18	$d(T_4G_4T_4G_4)$	$d(T_4G_4T_4G_4T_4G_4)$	1
	o,o5	625	o,o5	625			$pd(T_4G_4T_4G_4)$	$d(T_4G_4T_4G_4T_4G_4T_4G_4)$	
10	$d(G_4T_4)$		+ $pd(G_4T_4)$		o,o2	18	$d(G_4T_4G_4T_4)$	$d(G_4T_4G_4T_4G_4T_4)$	2
	o,o5	625	o,o5	625			$pd(G_4T_4G_4T_4)$	$d(G_4T_4G_4T_4G_4T_4G_4T_4)$	
11	$d(T_4G_4T_4)$		+ $pd(G_4T_4)$		o,o3	24	$d(T_4G_4T_4G_4T_4)$	$d(T_4G_4T_4G_4T_4G_4)$	9
	o,1o	83o	o,o7	83o			$pd(G_4T_4G_4T_4)$		
			$pd(G_4T_4G_4)$				$pd(G_4T_4G_4T_4G_4)$		
			o,1	83o					

Nr.	Ligase-Ansatz Acceptor		Donator		Enzym	Zeit	Kondensationsprodukte		Figur 8 Bahn
	A_{260}-Einh.	(pmol)	A_{260}-Einh.	(pmol)	(U)	(h)	Hauptprodukte	Nebenprodukte	
12	$d(G_4T_4G_4)$		+ $pd(T_4G_4)$		o,o3	24	$d(G_4T_4G_4T_4G_4)$	$d(G_4T_4G_4T_4G_4T_4)$	1o
	o,o8	65o	o,o6	65o			$pd(T_4G_4T_4G_4)$		
			+ $pd(T_4G_4T_4)$				$pd(T_4G_4T_4G_4T_4)$		
			o,o8	65o					
13	$d(T_4G_4)$		+ $pd(T_4G_4T_4G_4)$		o,o3	16	$d(T_4G_4T_4G_4T_4G_4)$		13
	o,o5 625	625	o,1	625					
14	$d(G_4T_4G_4)$		+ $pd(T_4G_4T_4G_4)$		o,o3	16	$d(G_4T_4G_4T_4G_4T_4G_4)$		15
	o,1o	625	o,14	83o					
15	$d(T_4G_4T_4G_4)$		+ $pd(T_4G_4)$		o,o3	16	$d(T_4G_4T_4G_4T_4G_4)$		14
	o,o6	375	o,o3	375				$pd(T_4G_4T_4G_4)$	
16	$d(T_4G_4T_4G_4)$		+ $pd(T_4G_4T_4)$		o,o3	16	$d(T_4G_4T_4G_4T_4G_4T_4)$		16
	o,o6	375	o,o5	375				Abbauprodukte	
17	$d(T_4G_4T_4G_4)$		+ $pd(T_4G_4T_4G_4)$		o,o3	16	—		17
	o,o6 37	375	o,o6	375					
18	$d(T_4G_4T_4G_4)$		+ $pd(T_4G_4T_4G_4)$		o,o3	16			18
	o,o6	375	o,o6	375			-----		
19	$d(T_4G_4T_4G_4)$		+ $pd(T_4G_4T_4G_4)$		o,o3	16	$d(T_4G_4T_4G_4T_4G_4T_4G_4)$		
a	o,o5	31o	o,5	31oo			$d(T_4G_4T_4G_4T_4G_4T_4G_4T_4G_4T_4G_4)$		19, 20
b	o,o5	31o	o,o5	31o					21, 22
c	o,o5	31o	o,oo5	31					23, 24

20	$d(G_4T_4G_4)$		$+ pd(T_4G_4T_4)$		o,o3	24	$d(G_4T_4G_4T_4G_4T_4)$		26, 27
	o,1o	83o	o,1o	83o			$d(G_4T_4G_4T_4G_4T_4G_4T_4G_4)$		
			$+ pd(G_4T_4G_4)$						
			o,1o	83o					

Faßt man alle Ergebnisse der durchgeführten Ligase-Reaktionen zusammen, so läßt sich sagen, daß Reaktionen, die mit Hilfe des Enzyms T_4-DNA-Ligase katalysiert sind, durchaus für den blockweisen Aufbau von Oligonucleotiden geeignet sind. Diese Tatsache gilt für die im vorliegenden Fall benutzten inverted-repeat-Sequenzen nur mit Einschränkungen, da aufgrund der vielen Möglichkeiten, mit denen die Donor/Acceptor-Verbindungen auf der einen, die Brückenverbindungen auf der anderen Seite, miteinander in Wechselwirkung treten können, die Ausbildung von Nebenprodukten bei den Kondensationen nicht ausgeschlossen werden kann. In einigen Fällen konnte sogar beobachtet werden, daß das erwartete Hauptprodukt nur in Spuren entstanden war, ein unerwartetes Nebenprodukt aber die Rolle des Hauptprodukts übernommen hatte.
Um die Ligase-Reaktion in Richtung auf einheitliche Produkte zu lenken, sollte man Brückenverbindungen und Donor/Acceptor-Verbindungen einsetzen, bei welchen sich nur in einer bestimmten Position die Möglichkeit von Wechselwirkungen ergeben würden.

C. EXPERIMENTELLER TEIL

1. Material

1.1 Geräte

Fraktionssammler	LKB 7ooo Ultrorac mit optischer Einheit Uvicord L I
Schlauchpumpe	Deuster, München
Thermostat	Haake FK 2
UV-Spektrometer	Zeiss PMQ II
Lyophilisator	Cont. Freeze Dryer, New Brunswick
Tischzentrifuge	Christ, Osterode
Evapomix	Buchler Instruments
Vakuumzentrifuge	Speed-Vac-Concentrator, Savant Instruments
Hochspannungs-elektrophorese	High-Voltage-Electrophorator, Model D, Gilson Med. Electronics
Liquid-Scintillation-Spectrometer	Packard Tri-Carb 3385
Netzgerät für Hochspannungsgel-elektrophorese	LKB 2197 Power Supply
HPLC	Chromatographiesteuergerät CCM, mit Rechnerintegrator 3o1, Spectro-Monitor III, Consta-Metric-Pumpen, alle LCD/Milton-Roy V4A-Stahlsäulen 25o x 4,6 mm, 25o x 8,o mm, Knauer

1.2 Reagenzien

Die verwendeten Reagenzien wurden von folgenden Firmen und aus unserem Institut bezogen.

A Pharma Waldhof, Mannheim, BRD
B Serva Feinbiochemica, Heidelberg, BRD
C Fluka AG, Buchs, Schweiz
D EGA Chemie, Steinheim, BRD
E Boehringer, Mannheim, BRD
F Carl Roth OHG, Karlsruhe, BRD
G Agfa-Gevaert, Stuttgart, BRD
H Merck, Darmstadt, BRD
I Amersham-Buchler, Braunschweig, BRD
K Pharmacia, Uppsala, Schweden
L Macherey-Nagel, Düren, BRD
M W&B Balston, Maidstone, USA
N Schleicher & Schüll, Dassel, BRD
O Chemisches Institut der Universität Tübingen

1.2.1 Chemikalien

Substanz	Bezug	Substanz	Bezug
Acetonitril	H	Calciumhydrid	H
Acrylamid	B	Chloroform	O
ADP	E	Diethylether	O
Ammoniumacetat	O	Dioxan	O
Ammoniumhydrogencarbonat	O	Dithioerithrol	F
Ammoniumperoxodisulfat	H	Dowex 5o WX 8 (H^+-Form)	B
Ammoniumsulfat	O	Eisessig	O
ATP	E	Ethanol	O
Bariumchlorid	O	Formamid	O
Benzoylchlorid	O	Glycerin	F
Blaugel	F	L-α-Glycerolphosphat	E
Borsäure	O	Harnstoff	O
Bromphenolblau	H	3-Hydroxypropionitril	C

Substanz	Bezug	Substanz	Bezug
Magnesiumchlorid	O	Nucleoside (dT, dG)	A
Methanol	O	Nucleotide (pdT, pdG)	A
Methylenchlorid	O	Petrolether (30 - 50)	O
1-Methylimidazol	D	Phosphorpentoxid	O
Molekularsieb 3A	F	Pikrinsäure	H
Molekularsieb 4A	D	1-Propanol	O
NAD	E	Pyridin	O
Natriumdihydrogen-phosphat	O	RNA	A,E
Natriumhydrogencarbonat	O	Siliconlösung	B
Natriumhydroxid	O	TBA	H
Natriumpyruvat	H	Toluol	O
Natriumsulfat	O	Triethylamin	O
N,N'-Methylenbis-acrylamid	B	Tris	H
N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin	B	Xylencyanol	H

Dioxan wird einmal über Calciumhydrid destilliert. Triethylamin wird destilliert und über Molekularsieb 3A gelagert. Pyridin wird über KOH destilliert; Pyridin, welches zu Kondensationen eingesetzt wird, lagert man über Molekularsieb 4A.

1.2.2 Chromatographiematerial

	Bezug
Borsäuregel	D
Cellulose-Acetat-Streifen 55o x 3o mm	N
Cellulose DC-Fertigfolien (Polygram CEL 3oo PEI)	L
Chromatographiepapier Nr. 2316	N
DC-Fertigplatten (Kieselgel 6oH, F_{254}) Schichtdicke o,25 mm	H
DEAE-Cellulose DC-Fertigfolien (Polygram CEL3ooDEAE/ HR-2/15)	L
DEAE-Cellúlose Whatman DE 23	M
Kieselgel 6oH (o,o4 - o,o63 mm)	H
Nucleosil 7 C_{18}	M
QAE-Sephadex A 25	K
Sephadex G-1o	K
Sephadex G-15	K

1.2.3 Radionuklide und Röntgenfilme

$[^{32}P]$ATP	I
$H_3[^{32}P]O_4$	I
Röntgenfilme Curix RP-1	G

1.2.4 Enzyme

	Bezug
Alkalische Phosphatase (14o U/mg; 1o mg/ml)	E
Glyceraldehyd-3-Phosphatdehydrogenase (8o U/mg; 1o mg/ml)	E
Glycerophosphatdehydrogenase (18o U/mg; 2 mg/ml)	E
Lactat-Dehydrogenase (55o U/mg; 5 mg/ml)	E
3-Phosphatglycerat-Kinase (45o U/mg; 1o mg/ml)	E
Phosphodiesterase aus Schlangengift (1,5 U/mg; 2 mg/ml)	E
T_4DNA-Ligase (25o U/1oo µl)	I
T_4 Polynucleotid-Kinase (5oo U/1oo µl)	I
Triosephosphat-Isomerase (5ooo U/mg; 2 mg/ml)	E

1.2.5 Synthetisierte Chemikalien

Folgende Reagenzien werden nach bekannten Methoden in unserem Labor synthetisiert.

Benzolsulfonsäure analog (4o)
o-Chlorphenylphosphorodichloridat (38)
Dimethoxytritylchlorid analog (35)
Isobuttersäurechlorid (39)
Monomethoxytritylchlorid analog (35)
1H-Tetrazol (37)
1,2,4-Triazol (41)
2,4,6-Triisopropylbenzolsulfonsäurechlorid (36)

1.3 Puffer

1.3.1 für die Kinase-Reaktion

2o µl Tris-HCl 1M pH 7,2
1o µl $MgCl_2$ 1M
1o µl DTE o,1M
1o µl Wasser
5o µl Glycerin

1.3.2 für die Elektrophorese

24o ml Harnstoff 7M
25 ml Eisessig
5 ml EDTA o,1M

1.3.3 für die Ligase-Reaktion

66o µl Tris-HCl 1M pH 7,2
66 µl $MgCl_2$ 1M
mit Wasser auf 1 ml auffüllen.

1.3.4 Sequenzierpuffer(1ox) pH 8,3

6o,5o g Tris
3o,9o g Borsäure
3,75 g EDTA
in Wasser lösen und auffüllen auf 1 l.

1.3.5 Sequenzierpuffer(1x) pH 8,3

Sequenzierpuffer(1ox) 1 : 1o mit Wasser verdünnen.

1.3.6 Auftragepuffer für die Gelelektrophorese

80% Formamid
10 mmol NaOH
1 mmol EDTA
0,1% Xylencyanol in Wasser
0,1% Bromphenolblau in Wasser

1.3.7 Puffer für die Darstellung von $[\gamma^{32}P]$ATP

1.3.7.1 E-Puffer

50 mmol Tris-HCl pH 9,0
5 mmol DTE

1.3.7.2 R-Puffer

250 ul Tris-HCl 0,5M pH 9,0
100 µl $MgCl_2$ 0,3M
150 µl DTE 0,1M
125 µl L-α-Glycerolphosphat 0,6mM
125 µl NAD 1mM (66mg/10 ml)
62,5 µl ADP 2mM (10 mg/10 ml)
62,5 µl wasser

1.4 Homomixe

Die Homomixe II, III und VI werden nach einer Vorschrift von E. Jay (28) dargestellt. Der Homomix II/III stellt eine Mischung im Verhältnis 1 : 1 der Homomixe II und III dar.

1.5 Darstellung geschützter Nucleoside und Mononucleotide

1.5.1 $[(MeO)_2Tr]$dibG

$[(MeO)_2Tr]$dibG wird analog einer Vorschrift von M. Gait (42) dargestellt. Dabei wird das Isobutyryldesoxyriboguanosin nicht direkt weiter umgesetzt, sondern als Zwischenprodukt isoliert.

1.5.2 $[(MeO)_2Tr]$dT, (MeOTr)dT

Die Darstellung der geschützten Nucleinsäurebausteine $[(MeO)_2Tr]$dT und (MeOTr)dT wird nach bekannten Methoden (42) durchgeführt.

1.5.3 $[(MeO)_2Tr]$dT(Bz) (24)

5 g (9,2 mmol) $[(MeO)_2Tr]$dT werden zweimal mit jeweils 5o ml wasserfreiem Pyridin zur Trockne einrotiert. Der Rückstand wird in 1oo ml wasserfreiem Pyridin aufgenommen und mit 5,4 ml (46 mmol) Benzoylchlorid versetzt. Nach einstündigem Rühren unter Feuchtigkeitsausschluß zeigt die DC-Kontrolle einen tritylpositiven Fleck, der schneller läuft als die Ausgangsverbindung. Die Lösung wird in 15o ml Chloroform aufgenommen und mit 1oo ml 1M Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen. Die Wasserphase wird mit 1oo ml Chloroform gewaschen. Die vereinigten Chloroformphasen werden mit 1oo ml Wasser ausgeschüttelt und zum Sirup einrotiert. Nach zweimaligem Abrotieren des Sirups mit jeweils 5o ml Toluol wird nach den in C.2.8.1 angegebenen Bedingungen detrityliert und anschließend an Kieselgel 6oH chromatographiert. (Tabelle 2)
Ausbeute: 2,7 g = 86 %

1.5.4 $[(MeO)_2Tr]dibG^{o} - Ba^{2+}_{o,5}$, $[(MeO)_2Tr]dT^{o} - Ba^{2+}_{o,5}$, $(MeOTr)dT^{o} - Ba^{2+}_{o,5}$ (23)

1o mmol der geschützten Nucleoside $[(MeO)_2Tr]dibG$, $[(MeO)_2Tr]dT$ oder (MeOTr)dT werden dreimal mit jeweils 5o ml trockenem Pyridin abrotiert.

4,15 g (6o mmol) 1,2,4-Triazol werden in 1oo ml trockenem Dioxan suspendiert und nacheinander mit 8,4 ml (6o mmol) Triethylamin und 4,9 ml (3o mmol) o-Chlorphenylphosphorodichloridat versetzt. Unter starker Trübung und Gelbfärbung erhitzt sich die Lösung auf 6o - 7o °C. Man rührt 45 min bei RT und saugt dann durch eine Fritte in den Rundkolben, in dem sich das Nucleosid befindet. Die resultierende gelbe Lösung läßt man bei RT 1 h reagieren, wobei eine leichte Trübung auftreten kann. Wenn die DC-Kontrolle vollständigen Umsatz zeigt (tritylpositiver Fleck am Ursprung), wird die Reaktionslösung auf 5oo ml Wasser gegossen. Der bei der Hydrolyse auftretende Niederschlag löst sich nach kurzer Zeit wieder auf. Das Hydrolysat gießt man langsam in 2 l einer kräftig gerührten, kalten, 1% Bariumchloridlösung, wobei das Nucleotid als Bariumsalz ausfällt. Der Niederschlag wird mittels einer Glasfritte abgetrennt und im Ölvakuum über P_4O_{1o} bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

Ausbeute: $[(MeO)_2Tr]dibG^{o} - Ba^{2+}_{o,5}$: 8,5 g = 95 %
$[(MeO)_2Tr]dT^{o} - Ba^{2+}_{o,5}$: 7,7 g = 96 %
$(MeOTr)dT^{o} - Ba^{2+}_{o,5}$: 7,1 g = 92 %

1.6 Darstellung von $[\gamma^{32}P]ATP$ (43)

Man bereitet sich eine Enzymstammlösung, die sich zusammensetzt aus:

35 µl Glycerophosphatdehydrogenase (12,6 U)
1 µl Triosephosphatisomerase (55 U)
2o µl Glyceraldehyd-3-Phosphatdehydrogenase (28 U)
2 µl 3-Phosphatglycerat-Kinase (9 U)
2o µl Lactat-Dehydrogenase (55 U)

Von dieser Enzymstammlösung pipettiert man 1o µl in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß und zentrifugiert 5 min. Der Überstand wird abgehoben; der Rückstand wird in 14o µl E-Puffer (C.1.3.7.1) aufgenommen und ergibt den sogenannten E-Mix. Durch Zusammenpipettieren von 37,5 µl R-Puffer (C.1.3.7.2) und 2,5 µl frisch angesetzter Natrium-Pyruvat-Lösung (4o mmol; 22 mg auf 5 ml) erhält man den sogenannten R-Mix. Die Reaktion läuft dann in folgenden Mengenverhältnissen ab:

5 Teile $H_3\,^{32}P\,O_4$ (5oo µCi - 1 mCi)
4 Teile R-Mix
1 Teil E-Mix

Der Reaktionsansatz wird 3o min bei RT inkubiert; dann wird ein Aliquot auf PEI-Cellulose mit $H_3[^{32}P]O_4$ als Referenz in o,8M Ammoniumsulfat chromatographiert und autoradiographiert. Der Reaktionsansatz wird an der Speed-Vac eingetrocknet und in 5oo µl Ethanol/Wasser 1 : 1 (v/v) aufgenommen.
R_f-Werte: $[\gamma^{32}P]$ATP: O,3; $H_3[^{32}P]O_4$: O,9

2. Methoden

2.1 Chromatographische Verfahren

2.1.1 Papierchromatographie

Die Papierchromatographie erfolgt absteigend auf Chromatographiepapier Nr. 2316 von Schleicher und Schüll. Laufmittelsysteme: A: Ethanol/1M NH_4Ac pH 7,5 (7 : 3 (v/v))
B: 1-Propanol/konz. NH_3/Wasser (55 : 1o : 35 (V/V/V))

2.1.2 Dünnschichtchromatographie

Zur Dünnschichtchromatographie werden DC-Fertigplatten (Kieselgel 6oH mit Fluoreszenzindikator 254 nm) mit einer Schichtdicke von o,25 mm verwendet. Um tritylierte Verbindungen feststellen zu können, wird die DC-Platte nach der Kontrolle mit der UV-Lampe mit Perchlorsäure/Ethanol (1 : 9

(v/v)) besprüht. $(MeO)_2Tr$-Gruppen färben sich dabei rot, (MeOTr)-Gruppen gelb.

Fließmittelsysteme: Chloroform/Ethanol 95 : 5 (v/v)
90 : 10 (v/v)
85 : 15 (v/v)
80 : 20 (v/v)

2.1.3 Chromatographie an Kieselgelsäulen

Das Reaktionsgemisch wird zum Sirup einkonzentriert, in 50 ml Chloroform aufgenommen und auf die Kieselgelsäule (Kieselgel 60H, 0,040 - 0,063 mm) aufgetragen. Dann eluiert man mit Chloroform so lange, bis die UV-Absorption des Eluats unter einen Wert von 0,5 A_{260}-Einheiten abgefallen ist. Mit Hilfe von Stufengradienten der Zusammensetzung Chloroform/Ethanol 98 : 2 (v/v) bis 80 : 20 (v/v) wird weiter eluiert, wobei der Durchfluß (ca. 1000 ml/h) hydrostatisch geregelt wird. Fraktionen von 20 ml werden gesammelt, wovon jede 10., bei Bedarf jede 5. Fraktion dünnschichtchromatographisch untersucht wird. Einheitliche Produktfraktionen werden vereinigt und entweder zur Trockne einrotiert oder auf ein Volumen von 20 ml eingeengt und aus 1 l Petrolether/Diethylether 4 : 1 (V/V)) gefällt. Der Niederschlag wird auf einer G4-Fritte abgesaugt und im Ölvakuum bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

2.1.4 Säulenchromatographische Trennung des entschützten Dodecanucleosidundecakisphosphats $d(T_4G_4T_4)$ an DEAE-Cellulose

Das Lyophilisat des entschützten Dodecanucleosidundecakisphosphats wird in 100 ml 7M Harnstoff gelöst und auf eine DEAE-Säule gepumpt. Die Säulenfüllung beträgt 2 x 50 cm und ist mit 7M Harnstoff equilibriert. Der Fluß wird mit einer Schlauchpumpe auf 250 ml/h eingestellt. Nach dem Auftragen der Probe wird die Säule im steigenden NaCl-Gradienten eluiert, der mit 0,05M Tris-HCl auf pH 7,5 gepuffert und mit

7M Harnstoff versetzt ist. Zunächst wird die Säule mit 1 l o,o5M NaCl-Puffer bei 2o °C, dann mit einem steigenden Gradienten bei 5o °C eluiert: 2 l o,o5M NaCl im Mischgefäß, 2 l o,15M NaCl im Vorratsgefäß; 2 l o,15M NaCl im Mischgefäß, 2 l o,3oM NaCl im Vorratsgefäß. Abschließend wird die Säule mit 1 l 1M NaCl eluiert. Fraktionen zu 2o ml werden gesammelt; bei jeder 5. Fraktion wird die Absorption spektralphotometrisch bei 26o nm gemessen. Gipfelfraktionen werden darüber hinaus noch bei 25o und 28o nm gemessen. Das Elutionsprofil (Figur 1) ergibt sich aus der graphischen Auftragung der bei 26o nm gemessenen Absorptionswerte gegen das Elutionsvolumen. Die Fraktionen innerhalb der senkrechten Strichelung werden vereinigt und an DEAE-Cellulose vom Harnstoff befreit. Hierzu verdünnt man die betreffenden Elutionslösungen mit Wasser auf das Vierfache ihres Ausgangsvolumens und pumpt die Lösung auf die DEAE-Säule(Säulenfüllung: 2 x 2o cm). Nach dem Auftragen wäscht man so lange mit Wasser, bis das Eluat kein Salz mehr enthält. Anschließend eluiert man die Säule mit 2oo ml o,5M NaCl. Die Elutionslösung wird auf ein geringes Volumen konzentriert und an einer Sephadex G 15-Säule (Säulenfüllung: 4 x 8o cm) vollends entsalzt. Die das Oligonucleotid enthaltende Lösung wird einkonzentriert und lyophilisiert.

2.1.5 HPLC

Die Trennungen werden bei RT an Nucleosil 7 C_{18} durchgeführt. Die Detektionswellenlänge beträgt 26o nm, der Fluß 1 ml/min für die analytische Säule(25o x 4,6 mm) und 2 ml/min für die präparative Säule(25o x 8,o mm). Fraktionen werden ca. 1o cm hinter dem UV-Detektor gesammelt, entsalzt und lyophilisiert.

Reversed-Phase-Chromatographie
Als mobile Phase dient eine Mischung aus o,o5M Ammoniumacetat pH 7,5 (Eluent A) und o,o5M Ammoniumacetat pH 7,5 in Methanol/Wasser 8o : 2o (v/v) (Eluent B).

Ionenpaar-Chromatographie

Hier dient eine Mischung aus 7,5mM TBA pH 7,o (Eluent A) und 7,5mM TBA pH 7,o in Acetonitril/Wasser 75 : 25 (v/v) (Eluent B) als mobile Phase. Die gesammelten Peakfraktionen werden wie folgt entsalzt. In einem 1oo ml Erlenmeyerkolben werden ca. 4o ml Methylenchlorid vorgelegt und mit der wässrigen TBA-Lösung überschichtet. Unter kräftigem Rühren wird so lange gesättigte, wässrige Pikrinsäurelösung zugetropft, bis die wässrige Phase einen ganz leichten Gelbstich behält. Die Phasen werden getrennt und an Sephadex G-15 entsalzt. Die entsalzte Oligonucleotidlösung wird einrotiert und lyophilisiert.

2.1.6 Gelelektrophorese

Die Stammlösung für ein 2o%-Polyacrylamid-Gel setzt sich wie folgt zusammen:

58 g Acrylamid
2 g N,N'-Methylenbisacrylamid
126 g Harnstoff
3o ml Sequenzierpuffer(1ox)(C.1.3.4)

Die Substanzen werden in Wasser gelöst und mit Wasser auf 3oo ml aufgefüllt. Zum Gießen eines Gels nimmt man 4o ml der Stammlösung, entgast sie, versetzt sie mit 8,8 µl TEMED und 27o µl 1o% APS in Wasser und gießt die erhaltene Lösung zwischen zwei vorbereitete Glasplatten.

Kleines Gel: 2o x 2o x o,1 cm
Großes Gel: 2o x 4o x o,o25 cm

Man läßt das Gel über Nacht durchpolymerisieren. Das Gel wird vorelektrophoretisiert(kleines Gel 8oo V, 3o mA; großes Gel 24oo V, 15 mA) bis es handwarm wird(ca. 3o - 6o min). Die Proben werden mittels einer ausgezogenen Mikropipette aufgetragen. Die Elektrophorese läßt man so lange laufen, bis der erste blaue Marker(Bromphenolblau) ungefähr die Hälfte der gesamten Laufstrecke durchlaufen hat. Anschließend werden die DNA-Fragmente mit Hilfe der Autoradiographie sichtbar gemacht.

2.2 Cyanoethylierung (24)

Die Cyanoethylierung verläuft bis zum Hydrolyseschritt analog zur Bariumsalz-Darstellung(C.1.5.4). Man fügt 2,1 ml (3o mmol) 3-Hydroxypropionitril und 2,33 ml (3o mmol) 1-Methylimidazol zu und rührt 3 h bei RT. Wenn in der DC-Kontrolle keine Phosphatkomponente am Startpunkt mehr erkennbar ist, wird das Lösungsmittel bei 37 ^{o}C abgezogen, der Rückstand in 2oo ml Chloroform aufgenommen und dreimal mit je 75 ml 1M Natriumdihydrogenphosphat-Lösung gewaschen. Die Wasserphasen werden mit 1oo ml Chloroform gewaschen und die vereinigten Chloroform-Phasen mit 5o ml Wasser gewaschen. Die organische Phase wird eingeengt, einmal mit 5o ml Toluol abrotiert und nach den Bedingungen von C.2.4.1 detrityliert. Das Rohprodukt wird an Kieselgel 6oH chromatographisch gereinigt. (Chromatographiebedingungen in Tabelle 2)

2.3 Kondensation

Die zu kondensierenden geschützten Verbindungen werden in 3o ml wasserfreiem Pyridin gelöst und durch drei- bis viermaliges Abziehen des Lösungsmittels im Ölvakuum absolutiert. Vor jeder neuerlichen Lösungsmittelzugabe wird das Reaktionsgefäß über eine mit Blaugel gefüllte Säule belüftet. Das Kondensationsmittelgemisch TPS/Tetrazol wird im Exsikkator getrocknet und auf einmal zugegeben. Das Reaktionsgefäß wird sofort wieder evakuiert und der Reaktionsansatz 1 h bei RT gerührt. Die Reaktion kann als beendet angesehen werden, wenn in der DC-Kontrolle die 5'OH-Komponente aus dem Ansatz verschwunden ist und ein neuer tritylpositiver Fleck gefunden werden kann.
Der Kondensationsansatz wird in 2oo ml Chloroform aufgenommen und mit 1oo ml 1M Natriumhydrogencarbonat-Lösung ausgeschüttelt. Die Wasserphase wird mit 15o ml Chloroform, die organischen Phasen zweimal mit je 1oo ml Wasser gewaschen. Die organische Phase wird zum Sirup einrotiert, der Sirup

zweimal mit je 1oo ml Toluol abrotiert. Der Rückstand wird in 25 ml Chloroform aufgenommen und über Kieselgel 6oH chromatographiert.(Tabelle 2)
Bei Produkten, die nachfolgend als 5'OH-Komponente eingesetzt werden sollen, wird vor der Säulentrennung die $(MeO)_2Tr$-Schutzgruppe mit Benzolsulfonsäure-Lösung abgespalten (C.2.4.1). Das Rohprodukt wird dann säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Tabelle 2).

2.4 Abspaltung der Schutzgruppen

2.4.1 Detritylierung(Darstellung von 5'OH-Komponenten)

1,38 bis 19,36 mmol des pyridinfreien Nucleosids oder Oligonucleosidphosphats werden mit 5o -15o ml Benzolsulfonsäure-Lösung(2% in Chloroform/Methanol 7 : 3 (v/v)) versetzt. Besitzt das Oligonucleotid Pyrimidin-Einheiten, sei es in terminaler oder einer sonstigen Position, so wird die Detritylierung bei RT nach 3 - 5 min beendet; sind aber Purin-Einheiten beteiligt, wird die Detritylierung bis zu 2 min bei -5 °C bis O °C durchgeführt. Während der Spaltungsreaktion wird kräftig gerührt. Die Reaktion wird nach DC-Kontrolle (der tritylpositive Fleck der tritylierten Verbindung verschwindet, stattdessen taucht ein neuer UV-Fleck auf, der aber nicht mehr tritylpositiv ist) beendet, indem man das Reaktionsgemisch in einen Scheidetrichter überführt, in dem 1oo ml Chloroform und 1oo ml 1M Natriumhydrogencarbonat-Lösung vorgelegt sind. Die Wasserphase wird abgetrennt und mit 75 ml Chloroform gewaschen. Die vereinigten Chloroformphasen werden zweimal mit je 5o ml Wasser gewaschen, zum Sirup einrotiert und der Sirup wieder in 5o ml Chloroform aufgenommen.
Die Aufarbeitung erfolgt auf zwei Wegen:
-Mono- bis Tetramere werden an Kieselgel 6oH chromatographiert (Tabelle 2). Die Produktfraktionen werden vereinigt, konzentriert und aus 1 l Petrolether/Diethylether 4 : 1 (v/v) gefällt; der Niederschlag wird mit einer G4-Fritte abgesaugt

und im Ölvakuum über P_4O_{10} getrocknet.
Pentamere und längere Oligonucleotide werden ohne chromatographische Reinigung direkt aus 1 l Petrolether/Diethylether 4 : 1 (v/v) gefällt, abgesaugt und über P_4O_{10} im Ölvakuum getrocknet. Die Ausbeuten liegen zwischen 7o% und 97%.

2.4.2 Decyanoethylierung

Zur Entfernung der Cyanoethylschutzgruppe wird das Oligonucleosidphosphat in 1o ml trockenem Pyridin und 1o ml trokkenem Triethylamin gelöst und unter Feuchtigkeitsausschluß 2 h bei RT gerührt. Das Ende der Spaltungsreaktion wird festgestellt, wenn ein neuer tritylpositiver UV-Fleck auftaucht, der am Startpunkt der DC sitzt. Das Triethylamin wird durch mehrmaliges Abrotieren mit Pyridin vertrieben, das decyanoethylierte Produkt wird aus 25o ml Petrolether/Diethylether 4 : 1 (v/v) gefällt, der Niederschlag abgenutscht und im Ölvakuum getrocknet. Die Ausbeuten betragen zwischen 85 und 95%.

2.4.3 Entschützen der synthetisierten Oligonucleotide

2.4.3.1 Basen- und Phosphatschutzgruppen sowie Benzoylschutzgruppe der 3'OH-Gruppe

Zum Syntheseprodukt gibt man 5o ml konz. NH_3 und läßt 5 Tage im gut verschlossenen Gefäß bei RT reagieren. Danach wird auf ein geringes Volumen konzentriert und lyophilisiert.

2.4.3.2 Tritylschutzgruppe

Das gesamte Lyophilisat aus C.2.4.3.1 wird in 3 ml eines Gemisches aus Eisessig/Wasser/Pyridin 14 : 1 : 1 (v/v/v) zur Abspaltung der (MeOTr)-Gruppe 18 h, zur Abspaltung der $(MeO)_2Tr$-Gruppe 12 h bei RT behandelt. Man neutralisiert

2.5 Sequenzierung von Oligonucleotiden nach der Fingerprintmethode

2.5.1 Kinase-Reaktion

Ansatz für o,o1 A_{26o}-Einheit

o,o1 A_{26o}-Einheit des Oligonucleotids
5 µCi $[\gamma\ ^{32}P]$ATP
5 µl Kinase-Puffer(C.1.3.1)
o,5 µl T_4-Polynucleotidyl-Kinase (2,5 U)

Das Reaktionsvolumen wird mit Wasser auf 2o µl aufgefüllt. Die Reaktionszeit beträgt 3o min bei 37 °C. Das radioaktiv markierte Oligonucleotid wird homochromatographisch an DEAE-Cellulose vom $[\gamma\ ^{32}P]$ATP abgetrennt, aus der DC-Platte eluiert und lyophilisiert.

Ansatz für o,1 A_{26o}-Einheit

o,1 A_{26o}-Einheit des Oligonucleotids
5o - 25o uCi $[\gamma\ ^{32}P]$ATP
5o µl Kinase-Puffer(C.1.3.1)
6 µl T_4-Polynucleotidyl-Kinase (3o U)

Der Ansatz wird mit Wasser auf 1oo µl aufgefüllt, 3o min bei 37 °C inkubiert, mit 2M TEAB pH 1o auf 1 ml aufgefüllt, auf eine mit 2M TEAB pH 1o equilibrierte Borsäuregel-Säule(44, 45) (Säulenfüllung 12o x 12 mm) aufgetragen und mit 2M TEAB pH1o eluiert. Man sammelt Fraktionen von 2 ml, jede Fraktion wird homochromatographisch untersucht. Produktfraktionen werden konzentriert und mehrmals mit Pyridin abrotiert, um das TEAB aus der Lösung zu entfernen. Pyridin wird durch zweimaliges Abrotieren mit Ammoniak ausgetrieben, der Rückstand in Wasser aufgenommen und lyophilisiert.

2.5.2 Partialabbau mit Phosphodiesterase aus Schlangengift

Das von der DEAE-Cellulose-Platte wird wie folgt partiell abgebaut:

1oo ooo cpm Oligonucleotid
5o µl Wasser
5 µl $MgCl_2$ o,o1M
8 - 15 µl PDE aus Schlangengift (o,o24 - o,o45 U)
je nach Kettenlänge

Der Ansatz wird gut durchgeschüttelt und bei 37 °C inkubiert. Proben zu 5 µl werden nach 5, 1o, 15, 2o, 3o, 45, 6o, 75, 9o und 12o min entnommen. Eine Probe läßt man über Nacht reagieren. Die Reaktion wird beendet, indem man jede Probe auf 9o °C erhitzt und dann mit flüssiger Luft einfriert. Die Proben werden vereinigt, eine Hälfte wird homochromatographisch aufgetrennt und ergibt die Kettenlänge des Oligonucleotids, die andere Hälfte wird für die nachfolgende zweidimensionale Chromatographie so weit wie möglich konzentriert.

Ist das markierte Oligonucleotid über Borsäuregel gereinigt, wird es nach folgenden Bedingungen abgebaut:

5oo ooo cpm Oligonucleotid
2o - 4o µl Wasser
1o - 3o µl PDE-Lösung (je nach Kettenlänge) (o,ooo3 - o,ooo9 U)

Für die PDE-Lösung wird die käufliche Enzymlösung mit $MgCl_2$ 5mM im Verhältnis 1 : 1oo verdünnt.
Das Reaktionsvolumen beträgt 5o µl, der Ansatz wird bei 37 °C inkubiert. Innerhalb von 15 min werden 8 bis 1o Proben zu 25 µl entnommen und wie oben beschrieben aufgearbeitet.

2.6 Enzymatische Verlängerung mit Hilfe der Ligase-Reaktion

Die Oligonucleotide werden nach den Angaben der Tabelle 4 ligiert. Die Reaktion wird in 5 µl Ligase-Puffer(C.1.3.3) 5 µl ATP o,o2M, 5 µl DTE o,1M und 37 µl Wasser durchgeführt,

die nacheinander zu der entsprechenden Oligonucleotidmenge zugegeben werden.
Nach beendeter Reaktion wird der gesamte Reaktionsansatz in einer Vakuumzentrifuge zur Trockne einrotiert, der Rückstand in Auftragepuffer für die Gelelektrophorese(C.1.3.6) aufgenommen und auf einem 2o%-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt.

D. ZUSAMMENFASSUNG

Das Oligonucleosidphosphat $d(T_4G_4T_4)$ wird aus dem octameren Block $(dibG^{O})_4(dT^{O})_3dT(Bz)$ und dem tetrameren Block $(MeOTr)(dT^{O})_4$ nach der Triestermethode in Lösung dargestellt. Nach erfolgter Synthese und Abspaltung der Schutzgruppen wird das erhaltene Oligonucleotidgemisch an DEAE-Cellulose gereinigt, wobei das Dodecamere $d(T_4G_4T_4)$ und nicht umgesetztes Octameres $d(G_4T_4)$in Mengen größer 20 mg isoliert werden. Danach werden die beiden Produkte mit HPLC an reverser Phase oder mit Hilfe der Ionenpaar-Chromatographie nachgereinigt und in chromatographisch reine Form gebracht.
Die Produkte werden mit Hilfe der Fingerprintmethode identifiziert.
Aus den von R. Semmler synthetisierten Oligonucleotiden $d(T_4G_4)$, $d(G_4T_4G_4)$ und $d(T_4G_4T_4G_4)$(27) und den beiden Oligonucleosidphosphaten $d(G_4T_4)$ und $d(T_4G_4T_4)$ werden auf enzymatischem Weg die Oligonucleotide $d(T_4G_4T_4G_4T_4G_4T_4G_4)$ und $d(G_4T_4G_4T_4G_4T_4G_4T_4G_4)$ kondensiert und in der Gelelektrophorese nachgewiesen.

E. LITERATUR

(1) E. Helftenbein
Nucleic Acids Res. 13, 415 (1985)

(2) H. J. Lipps, P. Erhardt
FEBS Lett. 126, 219 (1981)

(3) E. H. Blackburn
Cell 37, 7 (1984)

(4) M. H. Caruthers
in H. Gassen, A. Lang (eds.); Chemical and Enzymatic Synthesis of Gene Fragments, 71 (1982) Verlag Chemie, Weinheim

(5) C. B. Reese
Phosphorus Sulfur 1, 245 (1976)

(6) C. B. Reese
Tetrahedron 34, 3143 (1978)

(7) W. Pfleiderer
Kontakte (Merck) 1983 (2), 3

(8) S. A. Narang
Tetrahedron 39, 3 (1983)

(9) J. Stawinski, T. Hozumi, S. A. Narang, C. P. Bahl, R. Wu
Nucleic Acids Res. 4, 353 (1977)

(1o) J. C. Catlin, F. Cramer
J. Org. Chem. 38, 245 (1973)

(11) C. B. Reese, R. C. Titmas, L. Yau
Tetrahedron Lett. 19, 2727 (1978)

(12) J. F. M. de Rooij, G. Wille-Hazeleger, P.H. van Deursen, J. Serdijn, J. H. van Boom
Rec. Trav. Chim. Pays-Bas 98, 537 (1979)

(13) E. Ohtsuka, Z. Tozuka, S. Iwai, M. Ikehara
Nucleic Acids Res. 1o, 6235 (1982)

(14) V. A. Efimov, S. V. Reverdatto, O. G. Chakhmakhcheva
Tetrahedron Lett. 23, 961 (1982)

(15) A. K. Seth, E. Jay
Nucleic Acids Res. 8, 5445 (198o)

(16) H. J. Fritz, D. Eick, W. Werr
in H. Gassen, A. Lang (eds.); Chemical and Enzymatic Synthesis of Gene Fragments, 199 (1982) Verlag Chemie, Weinheim

(17) H. J. Fritz, R. Belagaje, E. L. Brown, R. H. Fritz, R. a. Jones, R. G. Lees, H. G. Khorana
Biochemistry 17, 1257 (1978)

(18) R. A. Jones, H. J. Fritz, H. G. Khorana
Biochemistry 17, 1269 (1978)

(19) W. Jost, R. Spatz, R. Ditz, F. Eisenbeiss
Labor-Praxis 8, 1o16 (1984)

(2o) W. Jost, R. Spatz, R. Ditz, F. Eisenbeiss
Labor-Praxis 8, 1184 (1984)

(21) M. Kwiatkowski, A. Sandström, N. Balgobin, J. Chattopadhyaya
Nucleic Acids Res. Symposium Series No. 14 (1984)

(22) C. B. Reese, P. A. Skone
J. Chem. Soc. Perkin Trans., 1263 (1984)

(23) G. R. Gough, C. K. Singleton, H. L. Weith, P. T. Gilham
Nucleic Acids Res. 6, 1557 (1979)

(24) W. A. Denny, W. Leupin, D. R. Kearns
Helvetica Chim. Acta 65, 2372 (1982)

(25) H. Ruess, Dissertation, Tübingen (1984)

(26) H. Schrade, Dissertation, Tübingen (1982)

(27) R. Semmler, Dissertation, Tübingen (1985)

(28) E. Jay, R. Bambara, R. Padmanabhan, R. Wu
Nucleic Acids Res. 1, 331 (1974)

(29) R. Frank, H. Blöcker
in H. Gassen, A. Lang (eds.); Chemical and Enzymatic Synthesis of Gene Fragments, 225 (1982) Verlag Chemie, Weinheim

(3o) M. J. Engler, C. C. Richardson
in P. D. Boyer (ed.); The Enzymes, 3rd Edition, Volume XV, 3 (1982) Academic Press, New York

(31) I. R. Lehman
in P. D. Boyer (ed.); The Enzymes, 3rd Edition, Volume X, 237 (1974) Academic Press, New York

(32) G. Klock
in H. Gassen, A. Lang (eds.); Chemical and Enzymatic Synthesis of Gene Fragments, 131 (1982) Verlag Chemie, Weinheim

(33) B. Weiss, A. Jaquemin-Sablon, T. R. Live, G. C. Fareed, C. C. Richardson
J. Biol. Chem. 243, 4543 (1968)

(34) A. M. Maxam, W. Gilbert
Methods in Enzymology 65, 499 (198o)

(35) Organikum, 15. Auflage, VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin(DDR) 623 (1977)

(36) H. G. Khorana
J. Amer. Chem. Soc. 88, 819 (1966)

(37) J. S. Mihina, R. M. Herbst
J. Org. Chem. 15, 1o82 (1956)

(38) M. H. Maguire, G. Shaw
J. Chem. Soc., 1479 (1953)

(39) Organic Syntheses, Collective Volume III, 49o (1955)

(4o) F. Muth
in Houben-Weyl, Band 9, 531 (1955) Georg Thieme Verlag, Stuttgart

(41) R. A. Henry, W. G. Finnegan
J. Amer. Chem. Soc. 76, 29o (1954)

(42) M. J. Gait, H. W. D. Matthes, M. Singh, B. S. Sproat, R. C. Titmas
in H. Gassen, A.Lang (eds.); Chemical and Enzymatic Synthesis of Gene Fragments, 1 (1982) Verlag Chemie, Weinheim

(43) R. A. Johnson, T. F. Walseth
Adv. Cyclic Nucl. Res. 1o, 135 (1979)

(44) H. Schott
Angew. Chem. 84, 819 (1972)

(45) H. Schott, E. Rudloff, P. Schmidt, R. Roychoudhury, H. Kössel
Biochemistry 12, 932 (1973)

Meine akademischen Lehrer waren:

E. Bayer, H. Eckstein, G. Gauglitz, G. Häfelinger, H. P. Hagenmaier, M. Hanack, V. Hoffmann, G. Jung, S. Kemmler-Sack, U. Kunze, D. Krug, E. Lindner, I. P. Lorenz, H. Oberhammer, D. Oelkrug, H. Pauschmann, G. Pausewang, W. Rundel, H. Schott, V. Schurig, F. F. Seelig, H. Stegmann, J. Strähle, H. Suhr, W. Voelter, W. Zeil.

LEBENSLAUF

Name:	Knut Cloß
Geburtsdatum/-ort:	16.6.1954 /Frankenholz bei Homburg/Saar
Familienstand:	verheiratet, ein Kind
1961 - 1965	Grundschule in Frankenholz
1965 - 1974	Saarpfalz-Gymnasium Homburg/Saar Abschluß: Abitur
Sept. 1974 - Mai 1975	Studienaufenthalt in Frankreich (Université Louis Pasteur, Strasbourg)
Mai 1975	Immatrikulation im Fach Chemie an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
Dez. 1981	Mündliche Diplomprüfung
Dez. 1981 - März 1982	Diplomarbeit: "Isolierung und Derivatisierung von Oligomeren der Desoxyriboadenylsäure"
April 1982 - Aug. 1985	Experimenteller Teil der Doktorarbeit am Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen unter Leitung von Herrn Prof. Dr. H. Schott: "Chemische und enzymatische Synthese von Fragmenten der terminalen inverted-repeat-Sequenz der DNA hypotricher Ciliaten"